

**Biología reproductiva y desove en cautiverio del pepino de mar
Stichopus sp.**

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Acuicultura y
Ecología Acuática Tropical

Vianys Yusseth Agudelo Martínez

Universidad del Magdalena
Maestría en Acuicultura y Ecología Acuática Tropical
Facultad de Ingeniería
Santa Marta D.T.C.H

2015

**Biología reproductiva y desove en cautiverio del pepino de mar
Stichopus sp.**

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Acuicultura y
Ecología Acuática Tropical

Vianys Yusseth Agudelo Martínez

Directora
Adriana Rodríguez Forero
Biólogo Marino, PhD

Universidad del Magdalena
Maestría en Acuicultura y Ecología Acuática Tropical
Facultad de Ingeniería
Santa Marta D.T.C.H

2015

APROBACIÓN

AGRADECIMIENTOS

A Dios creador y dador de la vida, que nunca me desamparó y siempre fue el faro que me guió en el arduo caminar de la vida.

A Colciencias y a la Universidad del Magdalena, entidades financiadoras del Proyecto “*Aspectos preliminares de la tecnología del cultivo del pepino de mar (Holothuria (Cystipus) occidentalis), en la Bahía de Santa Marta*”.

Así como al Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura (GIDTA).

A mi directora y amiga Adriana Rodríguez Forero por la confianza, la paciencia y la exigencia durante este tiempo; por guiar cada uno de los procesos y dificultades que se presentaron, por motivarme a soñar para poder cosechar los frutos del gran compromiso de ser una magister y guiarme en todo este proceso.

A todos los integrantes del GIDTA, que siempre me prestaron su colaboración y participaron activamente de este trabajo de investigación, en especial a Wensy por su invaluable ayuda en las extensas jornadas de trabajo.

DEDICATORIA

A Dios mi motor para emprender cualquier proyecto en la vida.

A mis padres Presentación Martínez la mujer que aportó el material genético para que me guste la ciencia y lo complejo del mundo animal; a Maximiliano Agudelo el hombre más sereno, meticuloso y comprometido que conozco. Ambos han sido el mejor ejemplo de amor y lucha constante; sin ser perfectos supieron sembrar en mí los deseos de superación y constancia.

A mis hermanos porque aún me enseñan que ser la hermana mayor no implica ser mamá gallina, en ellos siempre encontré una fuente de inspiración para ser su mejor ejemplo y un motivo de orgullo, a Lee porque cuando la veo siento que debo ser más y mejor, a Heyner que desde el cielo debe estar sonriendo y diciendo esa es mi hermana la que siempre consigue lo que quiere y a Max que me ve como la enana que todo lo puede.

A Luis por ser mi compañero de batalla y apoyo en los momentos más difíciles.

A mis docentes quienes enriquecieron mi pensar con todo el conocimiento compartido. A Adriana Rodríguez, docente, directora y amiga.

A mis amigos que siempre confiaron en mí y aportaron parte de su trabajo, esfuerzo e ideas para materializar este trabajo, en especial a Wensy, Marina, Leda, Jorge y Yahir.

A los pepinos de mar porque ellos fueron la principal herramienta de trabajo, culpables de muchos momentos de felicidad, emoción, tristeza y noches de traspaso en las cuales solo podía pensar en ellos. Además de ser una fuente de conocimiento valioso y enriquecedor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>Stichopus</i> sp. a) Morfotipos. b) Tentáculos expuestos y podios de un ejemplar erguido. _____	23
Figura 2. Microscopía de luz de las espículas encontradas en los tentáculos, podios y pared dorsal de <i>Stichopus</i> sp. a) torres desde diferentes vistas (lateral, superior e inferior); b) barrote curvo aserrado; c) barrote liso; d) cuerpos en forma de C. _____	24
Figura 3. Disección de los individuos de <i>Stichopus</i> sp. a) Corte ventral transversal en dirección posterior-anterior, b) Morfología interna: i, intestino, ar, árbol respiratorio y g, gónada. _____	31
Figura 4. Fragmento de tejido gonadal utilizado para el procesamiento histológico. ____	31
Figura 5. Hembra de <i>Stichopus</i> sp. a) Conexión gonadal hacia el poro germinal; b) Individuo con intestino diferenciado (I) y gónada (G) en crecimiento; c) Individuo completamente maduro. _____	33
Figura 6. Gónadas femeninas de <i>Stichopus</i> sp. a) Vista macroscópica de los túbulos con fagocitos (TF), b) Microscopía de luz que muestra ovocitos “en fresco”, en proceso de crecimiento y vesícula germinal (VG) claramente diferenciada. _____	34
Figura 7. Gónadas masculinas de <i>Stichopus</i> sp. a) Vista macroscópica; (b) Microscopía de luz en la que se aprecian cortes “en fresco” de los canales seminíferos dirigidos hacia el lumen. _____	34
Figura 8. Proporción de sexos de <i>Stichopus</i> sp. durante un año de muestreo (Febrero/2013 a Enero/2014). $n = 120$. ($X^2 = 0.314$, $P < 0.05$). _____	35
Figura 9. Índice gonadosomático mensual de <i>Stichopus</i> sp., con la desviación estándar (DS) $n = 120$. (Febrero/2013 a Enero/2014). _____	36
Figura 10. Índice gonadosomático por sexo de <i>Stichopus</i> sp. (Febrero/2013 a Enero/2014). $n = 120$. _____	37
Figura 11. Histología del desarrollo gonadal de hembras de <i>Stichopus</i> sp. a) Recuperación. 10X; b) Recuperación. Se observa el epitelio exterior (EE), el epitelio germinal (EG) y ovocitos inmaduros (OI), basófilos. 40X; c) Crecimiento. Con abundantes ovocitos inmaduros (OI) y otros en estados de desarrollo previtelogénico (OPV) y vitelogénico (OV), marcadamente eosinófilos. 10x; d) Maduro. Se aprecian abundantes ovocitos previtelogénicos (OPV) y vitelogénicos (OV), que contienen una gran vesícula germinal. e). Parcialmente desovado. Muestra folículos vacíos (*) y ovocitos vitelogénicos (OV), con su vesícula germinal y un nucléolo periférico. f) Postdesove. Muestra un tejido deteriorado, con ovocitos remanentes (OR), basófilos y presencia de abundantes fagocitos (F) (febrero a diciembre/2013). La barra equivale a 20µm. H-E. _____	41
Figura 12. Histología del desarrollo gonadal de machos de <i>Stichopus</i> sp. a) Recuperación. Se observa una capa gruesa de tejido conectivo y capas de tejido germinal basófilas. Lúmen vacío. 40x; b) Crecimiento. Fina capa de tejido conectivo que circunda los túbulos espermáticos 40x, en el que se aprecian fácilmente abundantes espermatogonias (E) y espermatocitos (Ec) revelados en la fotografía 4(c) 100x. d) Maduros. En el lumen tubular se sitúan espermatozoides (Z) listos para ser liberados. En el folículo seminal se observan abundantes espermatocitos (Sc). 10x. e) Postdesove. Folículo seminal vacío. Pared tubular con epitelio germinal. 40x. (febrero/2013 a enero/2014). La barra equivale a 20µm. H-E. 42	

Figura 13. Frecuencia de desarrollo gonadal de las hembras de Stichopus sp. (Febrero/2013 a Enero/2014). n = 120. _____ 45

Figura 14. Frecuencia de desarrollo gonadal de los machos de Stichopus sp. (Febrero/2013 a Enero/2014). n = 120. _____ 45

Contenido

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
Marco Teórico	19
Aspectos generales.....	19
Biología reproductiva	19
CAPITULO I. MORFOLOGÍA GONADAL DE LOS PEPINOS DE MAR.....	26
METODOLOGÍA.....	29
Análisis de datos.....	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51
Capítulo II. Advances on spontaneous captive breeding and culture conditions of Caribbean sea cucumber Stichopus sp.....	59
CONCLUSIONES GENERALES.....	67
OBSERVACIONES FINALES.....	68
RECOMENDACIONES.....	69

Propiedad intelectual

Acorde con el artículo 25 del Código Contencioso Administrativo, los conceptos publicados en esta sección, no comprometen la responsabilidad de la Dirección Nacional de Derecho de Autor, ni son de obligatorio cumplimiento o ejecución.

Declaro que el contenido del presente documento es producto de mi propia investigación, por ello de mi entera autoría. Toda la información proveniente de otros trabajos está debidamente identificada con su respectiva referencia y se incluye en la bibliografía.

Este estudio es un producto de trabajo de investigación que se desprende del proyecto: “**Aspectos preliminares de la tecnología del cultivo del pepino de mar (*Holothuria (Cystipus) occidentalis*) en la región de Santa Marta**”, cofinanciado por Colciencias y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad del Magdalena (No 1117-521-28356).

RESUMEN

Los holotúridos o pepinos de mar representan un importante recurso en la cadena trófica y ecológica de los océanos del mundo, y a la vez son un producto farmacéutico o alimenticio de gran riqueza comercial. En Colombia existe discreta información básica sobre las especies nativas del Caribe. El propósito de este estudio fue definir en *Stichopus* sp, los estadios gametogénicos durante un ciclo anual, describir los desoves en condiciones de laboratorio y su posterior desarrollo embrionario. Los estudios se realizaron durante dos años en el sector del Rodadero (Santa Marta). Para detallar las fases gonadales, 120 individuos fueron colectados durante un año y transportados hasta el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad del Magdalena. En los organismos se evaluó el índice gonadosomático (IG) y se describió el desarrollo gonadal mediante histología. Los animales fueron pesados y sacrificados, posteriormente fueron disecados para pesar las gónadas y fijar fracciones de este tejido ($\leq 1\text{g}$) en formol al 4 %, luego de lo cual fueron procesados mediante histología (cortes de 5μ y tinción con H-E). El IG varió considerablemente durante el periodo de muestreo, los valores bajos (0.33 - 0.42) se registraron entre los meses de febrero a abril, aumentando a partir de mayo hasta alcanzar el máximo valor durante octubre. Por otra parte, se describen las condiciones de manejo asociadas a la reproducción y el cultivo larval de la especie en condiciones controladas ($^{\circ}\text{T}$:26°C; pH:8.10; Salinidad: 36 UPS). En el laboratorio de Acuicultura durante 2012 y 2013, se presentaron eventos de desove y espermiación de las especies cultivadas en tanques de 550 L de capacidad. Se produjeron un promedio de 48.4×10^6 ovocitos fertilizados, que se desarrollaron hasta el estadio de

auricularia tardía. El estudio concluye que el pico gonadosomático es concordante con las fases de desarrollo gametogénico. En hembras se presentaron 5 fases de desarrollo gonadal: Recuperación, crecimiento, maduro, parcialmente desovado y postdesove; mientras que en los machos se identificaron 4 fases de desarrollo gonadal: Recuperación, crecimiento, maduro y postdesove. Por otra parte, es posible mantener reproductores de pepino de mar en laboratorio y obtener desoves consecutivos exitosamente. Sin embargo, las condiciones para el mantenimiento y levante de larvas deben ser optimizadas para mejorar la supervivencia.

Palabras clave: auricularia, desove, histología, reproducción, *Stichopus*.

INTRODUCCIÓN

Los Holotúridos conocidos mundialmente como "pepinos de mar", habitan en casi todos los ambientes marinos del mundo. Ecológicamente juegan un importante papel pues son considerados como reguladores del sustrato marino, ya que debido a sus hábitos alimenticios reducen las concentraciones de sulfatos volátiles y aumentan el potencial de óxido reducción generando un reciclaje de nutrientes inorgánicos y a la vez renovando la composición del suelo (Abdel-Razek *et al.*, 2005). Además de su importancia ecológica, estos organismos han sido considerados como una fuente alimenticia por sus cualidades nutricionales (Abdel-Razek *et al.*, 2005).

Tradicionalmente los pepinos de mar se han ofertado en los continentes asiático y europeo como un plato exquisito en el área gastronómica. Desde la época de la Dinastía Ming (1368-1644 A.C.), han sido considerados por la población asiática como un alimento de gran importancia médica y nutricional. Según la medicina tradicional china, el pepino de mar “nutre la sangre” y contiene una esencia vital (*jing*), que tonifica el riñón (trata trastornos del sistema renal y de los órganos reproductivos) y humedece las mucosas (especialmente del intestino) (Chen, 2003). Por lo tanto, en ese país es conocido con el nombre popular de *Haishen*, lo que significa, el *ginseng* del mar (Anderson, 1988; Enquin, 1988).

Además de su uso gastronómico, existen otras aplicaciones en las industrias farmacéutica y cosmética. Entre las aplicaciones modernas es muy común

encontrar cápsulas o tabletas de suplementos nutricionales a base de pepino de mar seco, cuya presentación contiene hasta un 83% de proteína (Chen, 2003).

En la actualidad se conocen casi 1.400 especies de pepinos de mar en los océanos del mundo (James, 2001), de las cuales menos de un centenar son aprovechadas por el hombre. Su demanda internacional hasta 2010, ascendía a 7.299 toneladas y en los últimos años se ha registrado un incremento promedio de aproximadamente 900 toneladas anuales (Purcell, 2010). Como resultado de esta tendencia las poblaciones de pepino de mar han sido sobre-explotadas en muchos países. La captura global total de pepinos de mar se calcula en alrededor de 100.000 toneladas de animales vivos por año (Purcell, 2010). Entre los principales países consumidores se encuentran China, Taiwán, Japón, Hong Kong, Corea, Malasia y Tailandia. El precio de las capturas varía entre las especies y también entre la misma especie, lo cual depende del tamaño del animal y del cuidado con el que sea procesado. Entre las especies de mayor importancia comercial se destacan *Apostichopus japonicus* y *Holothuria scabra* (Purcell, 2010).

Los pepinos de mar se pescan en todo el mundo, especialmente en las regiones tropicales (Conand y Byrne, 1993; Conand, 2006; Toral-Granda *et al.*, 2008). La mayoría de las especies explotadas comercialmente pertenecen al orden Aspidochirotida, específicamente a las familias Holothuridae y Stichopodidae, y son generalmente tropicales; aunque también se pescan comercialmente algunas pertenecientes al orden Dendrochirotida y la familia Cucumariidae (Purcell *et al.*, 2012).

Las pesquerías tropicales contribuyen a la mayoría de las capturas globales e involucran muchas especies (generalmente entre 10 y 35), con variados rasgos ecológicos y biológicos (Toral-Granda *et al.*, 2008). A pesar de que las pesquerías en América Latina y el Caribe empezaron en las últimas dos décadas, estas han sido en su mayoría insostenibles, causando una disminución drástica de las poblaciones naturales y la extinción local en algunas zonas (Toral-Granda, 2008; Kinch *et al.*, 2008). En Colombia, se ha venido llevando a cabo un inadecuado manejo de este recurso, lo cual a largo plazo puede poner en riesgo la preservación de las especies, como viene sucediendo en otros países. Desde 2005 existen reportes no oficiales sobre producción de pepino de mar y en ese año se exportaron 1.646 Kg de peso seco. Según Toral-Granda (2008), en Colombia la pesca del pepino de mar se realiza de forma ilegal, no declarada y no reglamentada con miras a abastecer el mercado asiático y no existe suficiente documentación relacionada con las especies existentes (Rodríguez *et al.*, 2013).

El conocimiento sobre el estado de las poblaciones y avances tecnológicos de las especies de importancia comercial es más avanzado en los países desarrollados, tales como Canadá, Estados Unidos, Japón, China y Australia, debido a que tienen mayor capacidad para llevar a cabo monitoreos y análisis de datos pesqueros y biológicos. El resultado de este seguimiento está reflejado en un mejor desarrollo y aplicación en regulaciones de manejo pesquero; comparado con los países en desarrollo, es evidente las limitaciones para implementar estos estudios y regulaciones (Purcell, 2010). Los escasos estudios publicados acerca de las especies existentes en Colombia se refieren únicamente a taxonomía, distribución

y ecología (Bayer *et al.*, 1970; Caycedo, 1978; Caycedo, 1979; Álvarez y Ramón, 1981; González *et al.*, 2002; Borrero-Pérez *et al.*, 2003); pero no existen estudios sobre dinámica poblacional, ecología o biología de las especies y mucho menos acerca de su potencial de cultivo en condiciones controladas (Agudelo y Rodríguez, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013).

La producción de pepinos de mar en espacios controlados es una realidad para algunos países de Asia y Europa. Hasta la fecha se han desarrollado técnicas confiables para el desove inducido en los holotúridos, pero estos solo están enfocados en pocas especies. La tecnología para la reproducción de algunas especies a nivel comercial está bien documentada en *Apostichopus japonicus* (Wang y Cheng, 2004; Liu *et al.*, 2004), *Holothuria scabra* (Battaglione, 1999; Agudo, 2006; Lavitra *et al.*, 2009), *H. lessoni* (antes *H. scabra* var. *versicolor*; Giraspy e Ivy, 2005), *H. spinifera* (Asha y Muthiah, 2005) e *Isostichopus fuscus* (Mercier *et al.*, 2004).

Las especies de pepino de mar que comúnmente se reproducen controladamente en la actualidad son *Apostichopus japonicus* en climas templados y *Holothuria scabra* en las zonas tropicales; la técnica de producción de juveniles para estas dos especies se ha establecido en China, Japón, India, Indonesia y las Islas Salomón, entre otros (James, 1996; Battaglione *et al.*, 1999).

El conocimiento sobre las especies con potencial comercial en Latinoamérica es escaso, algunos estudios realizados por Guzmán *et al.* (2003), presentan los

parámetros básicos de la biología reproductiva de *I. badionatus* y *H. mexicana* en la costa de Panamá. Por otro lado en México se han desarrollado estudios con el fin de conocer el ciclo reproductivo de *I. fuscus* (Herrero-Perezrul, 1994; Fajardo-León *et al.*, 1995; Fajardo-León *et al.*, 2008), *Parastichopus parvimensis* (Tapia-Vázquez *et al.*, 1996), *P. californicus* (Cameron y Fankboner, 1986) y *Neothyone gibbosa* (Herrero-Perezrul, 1994), con resultados que contribuyeron al conocimiento básico de las especies y permitieron desarrollar avances para su reproducción controlada, pero sin viabilizar su producción a gran escala. En Ecuador, Mercier *et al.* (2004) determinaron que los cultivos de *I. fuscus* son una alternativa sostenible frente a la problemática pesquera de este recurso.

La necesidad de generar propuestas que permitan suplementar los vacíos de conocimiento sobre el pepino de mar nativo y que a su vez se constituyan como herramientas tecnológicas para cultivos experimentales, es una realidad para el país. La Universidad del Magdalena viene realizando estudios para generar conocimiento sobre su biología, fisiología y los factores relacionados con su reproducción, como base para determinar su potencial reproductivo y la subsecuente viabilidad de su producción controlada; además los estudios de reproducción son requisito fundamental para el manejo de cualquier actividad pesquera o acuícola. Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio tuvo como objetivos generales describir las fases gametogénicas durante un ciclo anual, los desoves en condiciones de laboratorio y el desarrollo embrionario del pepino de mar *Stichopus* sp. Estos objetivos son desglosados ampliamente en los capítulos que componen el presente trabajo. Con estos estudios se genera un aporte fundamental

para iniciar el desarrollo del paquete tecnológico de cultivo de esta especie. Además, el mismo se constituye como un insumo para el desarrollo de medidas de manejo pesquero soportadas con el comportamiento reproductivo de este recurso, determinadas por indicadores reproductivos y el análisis histológico de las gónadas de estos individuos, durante un año de muestreo en la costa norte de Santa Marta (Colombia).

Marco Teórico

Aspectos generales

Los pepinos de mar pertenecen a la clase Holothuroidea, del griego *holothurion* (que denota una clase de zoofito), conocidos vulgarmente también como carajos de mar o gusanos, son una clase de la familia de los Equinodermos, compuesta por animales de cuerpo alargado que viven en los mares de todo el mundo (Kerr *et al.*, 2005).

Algunas especies llegan a pesar hasta dos kilogramos y a medir un metro de longitud (Kerr *et al.*, 2005). Han sido encontrados en todas las profundidades conocidas del mar, incluso en las ventilas hidrotermales -chimeneas del fondo marino por las que salen lava y gases sulfurosos- (Pérez-Ruzafa, 1984). Viven sobre el fondo, enterrados en la arena, sobre o debajo de las rocas y entre los corales (Hyman, 1955; Richmond *et al.*, 1996). Se alimentan del sedimento y con ello mantienen limpio el suelo de materia orgánica (Kerr *et al.*, 2005; Roberts y Bryce, 1982).

Biología reproductiva

En los invertebrados marinos la gametogénesis, el desove y la espermiación son procesos fisiológicos asociados a factores ambientales. Las observaciones realizadas en campo han permitido establecer la interacción entre las variaciones de los factores ambientales y la sincronización para la expulsión de los gametos (Lawrance y Herrera, 2000).

Los pepinos de mar son principalmente gonocóricos, es decir, hay machos y hembras. Sin embargo, se han registrado alrededor de 12 especies hermafroditas (Pawson *et al.*, 2010). En la mayoría de especies gonocóricas, no es posible distinguir a los machos y hembras por su apariencia externa y las poblaciones de pepinos de mar tienen generalmente una proporción de sexos 1:1 (Kerr *et al.*, 2005).

La mayoría de los pepinos desovan liberando sus gametos (espermatozoides y oocitos) directamente en la columna de agua. Las hembras pueden liberar miles de millones de oocitos en un solo evento de desove (Purcell, 2010). El éxito reproductivo es, por ende, maximizado cuando los machos y las hembras están relativamente próximos el uno del otro. La liberación de los gametos está generalmente desencadenada por estímulos ambientales, es decir, condiciones específicas de la marea, fases lunares y fluctuaciones de temperatura; Así como por señales químicas de otros individuos de la misma especie (Ong Che y Gómez, 1985; Hamel *et al.*, 1993; Conand y Byrne, 1993; Morgan, 2000; Ramofafia *et al.*, 2000; Asha y Muthiah, 2008; Fajardo-León *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2013).

El comportamiento reproductivo de los pepinos de mar ha sido ampliamente estudiado permitiendo la descripción de los desoves asociados a la clasificación taxonómica (Guzmán *et al.*, 2003; Pawson *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013; Zacarías-Soto *et al.*, 2013; Agudelo y Rodríguez, 2015). Según Pawson *et al.* (2010), los pepinos Aspidoquirótidos se balancean hacia adelante en “posición de cobra” y los Dendrochirotidos, utilizan el movimiento de sus tentáculos para expulsar y mezclar los gametos.

Los ciclos reproductivos varían entre las especies, pero la mayoría de las especies tropicales tienden a tener un pico reproductivo a inicios del verano (Conand, 1993; Guzmán *et al.*, 2003 Conand, 2008; Kinch *et al.*, 2008; Zacarías-Soto *et al.*, 2013; Agudelo y Rodríguez, 2015).

Adicionalmente a la reproducción sexual, cerca de 10 especies se reproducen asexualmente al dividirse por la mitad de su cuerpo; ambas partes regeneran los órganos y forman clones del individuo original. Este modo de reproducción también conocida como fisión transversal, puede o no ocurrir en diferentes estaciones del año en comparación con la reproducción sexual de varias especies y en poblaciones que también se reproducen sexualmente; pero la importancia evolutiva y ecológica de esta estrategia es considerada todavía como un tema de debate (Ghiselin, 1987; Mladenov y Emson, 1988; Gouyon *et al.*, 1993; Uthicke, 1997; Conand, 2006).

En la fase larvaria, los pequeños organismos presentan una vida planctónica, la mayoría de la cual atraviesa diferentes estadios: algunas especies de los órdenes Aspidochirotida y Apodida presentan desarrollo indirecto con una larva planctónica llamada auricularia (fase en que se alimenta); sin embargo, la mayoría de los holotúridos presentan desarrollo directo con una larva llamada doliolaria de carácter lecitotrófico, a la cual no se le suministra alimentación, seguida de la pentaculata, hasta su posterior desarrollo como juvenil, donde se establece el asentamiento (Raff y Byrne, 2006; Pawson *et al.*, 2010). En estado adulto, presentan un comportamiento gregario y bentónico (Hamel *et al.*, 2003; Agudo, 2006).

Características de la especie

Taxonómicamente los pepinos de mar se han agrupado a nivel de Orden, Familia e incluso Género, utilizando algunos caracteres morfológicos externos e internos como son: forma del cuerpo, presencia ausencia de los arboles respiratorios, forma del anillo calcáreo, la presencia o ausencia de dientes anales, de la cloaca, de las vesículas de Poli, de los túbulos de Cuvier, de los pies ambulacrales, así como su disposición; la posición del ano y la boca; el número y forma de tentáculos; la disposición de las gónadas, los músculos faríngeos, entre otros (Laguada-Figuera, 2001; Zetina et al., 2002; Solís-Marín *et al.*, 2009; Prieto, 2010).

Clasificación taxonómica

Filo: Echinodermata

Clase: Holothuroidea

Orden: Aspidochirotida

Familia: Stichopodidae

Género: Stichopus

Especie: *Stichopus* sp.

***Stichopus* sp.**

Esta especie está asociada a la familia Stichopodidae por sus características distintivas: Coloración variada, que va de una tonalidad café claro hasta un café rojizo. Cuerpo alargado de forma trapezoidal, con numerosas papilas que terminan en una fina proyección, las cuales se encuentran distribuidas en la parte dorsal y bordean todo su cuerpo. Además dependiendo del morfotipo, presentan manchas en diferentes tonos de café (rojizo, claro, oscuro) (Figura 1a); la boca se encuentra en posición ventral y está rodeada de 18 a 20 tentáculos peltados grandes de color crema, mientras que el ano está ubicado de manera terminal en el extremo posterior. En su porción ventral presenta numerosos podios distribuidos en tres hileras, con la misma coloración de los tentáculos, y sus gónadas son bifurcadas (Figura 1b).

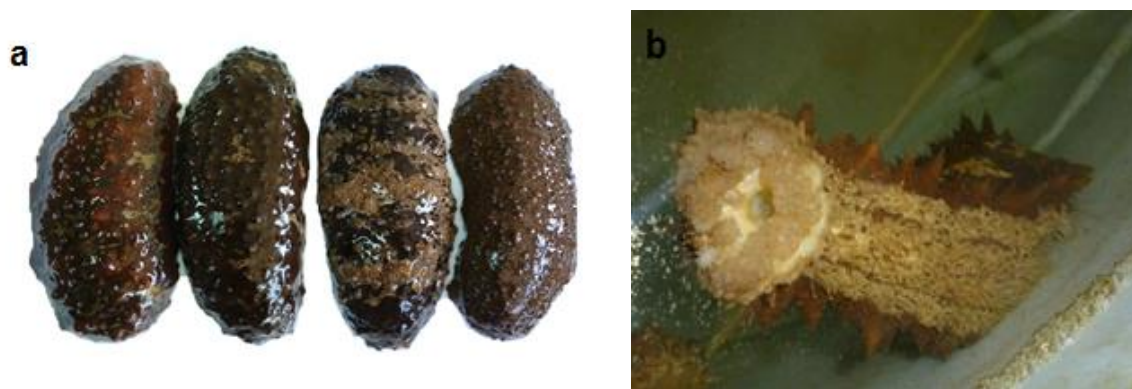


Figura 1. Características morfológicas de *Stichopus* sp. a) Morfotipos. b) Tentáculos expuestos y podios de un ejemplar erguido.

Esta especie presenta diferentes formas de espículas como son las abundantes torres presentes en los podios, tentáculos y pared dorsal con un diámetro promedio de $49.82 \pm 1.15 \mu\text{m}$ (Figura 2 a); además de abundantes barrotes curvos con

aserrados en posición terminal y longitudinal (Figura 2b). En la porción dorsal del cuerpo abundan las espículas en diversas formas como torres, placas perforadas, barrotes lisos y aserrados y cuerpos en formas de C de diferentes tamaños (Figura 2 a – f).



Figura 2. Microscopía de luz de las espículas encontradas en los tentáculos, podios y pared dorsal de *Stichopus* sp. a) Torres desde diferentes vistas (lateral, superior e inferior) 40 x; b) Barrote curvo aserrado 40x; c) Barrote liso 40x; d) Cuerpos en forma de C 40x; e y f) Placas perforadas. 10x. Barra de escala equivalente a 20 μm.

En la actualidad el Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura está realizando estudios genéticos para confirmar la especie. Pruebas preliminares indican que esta se acerca a *Isostichopus badionotus* pero las alineaciones muestran grandes diferencias (> 10%) que podrían indicar que la secuencia de ADN (16S y 18S) pertenece a una especie que no se encuentran en la base de datos (ya sea porque es una nueva especie o porque son especies conocidas pero cuyo 16S aún no ha sido secuenciado). Estas secuencias se orientan hacia el género *Stichopidae*. Este estudio se constituirá en el primer registro genético de especies nativas de pepino de mar en Colombia.

CAPITULO I. MORFOLOGÍA GONADAL DE LOS PEPINOS DE MAR

La mayoría de las especies de pepino de mar son dioicas, sin dimorfismo sexual externo, por lo tanto el sexo solo puede ser determinado mediante el examen microscópico de sus gónadas. La morfología gonadal presenta amplias variaciones entre familias, especies de la misma familia e incluso entre poblaciones, tales como: formas (túbulos, nódulos, sáculos), grosor, longitud, ramificación e incluso estadio de desarrollo (Smiley, 1988; Hamel y Mercier, 1996; Foglietta *et al.*, 2004; Ramos-Miranda *et al.*, 2012).

Las gónadas de los pepinos de mar están constituidas por una red de túbulos unidos al mesenterio dorsal, a través del cual pasa el gonoducto y terminan en el gonoporo o papila genital (Giese *et al.*, 1991).

Autores como Foglietta *et al.* (2004) han realizado estudios sobre el ritmo de desarrollo gametogénico del pepino de mar, concluyendo que la gónada de algunas especies se desarrolla de manera asincrónica, es decir, se presentan diferentes fases de maduración en un mismo periodo de tiempo.

Ramos-Miranda *et al.* (2012), determinaron que el tamaño y ubicación de las gónadas está asociado al estado de madurez del individuo; es así como gónadas inmaduras se encuentran principalmente en la parte anterior del pepino, mientras que las gónadas maduras ocupan una considerable área del mesenterio del animal.

Teniendo en cuenta la morfología y observaciones histológicas de los túbulos gonadales, varios autores han descrito 4 estadios de madurez generales para machos y hembras: inmaduro (I), recuperación o reposo (II), maduro (III) y desovado (IV); pero adicionalmente se pueden presentar estadios intermedios como crecimiento, desove parcial y pre-desove (Tuwo y Conand, 1992; Hamel *et al.*, 1993; Herrero-Perezrul *et al.*, 1999; Ramofafia *et al.*, 2000; Toral-Granda y Martínez, 2007; Fajardo-León *et al.*, 2008).

A continuación se realiza la descripción de los diferentes estados gonadales con base en las observaciones de Hamel *et al.* (1993), Ramofafia *et al.* (2000), Toral-Granda y Martínez (2007) y Fajardo-León *et al.* (2008).

Inmaduro (I): Gónadas sin células sexuales diferenciadas o con gametos que no presentan estructuras celulares definidas. Abundante tejido conectivo en el lumen y entre los folículos y pared gonadal delgada. Se presentan algunos fagocitos pequeños.

Recuperación o reposo (II): Recibe este nombre porque los oocitos previtelogénicos se forman de nuevo a partir del epitelio germinal, después del periodo de desove y la posterior reabsorción de los oocitos vitelogénicos no desovados que quedaron en el lumen. La pared gonadal tiene su máximo grosor. En algunas secciones del epitelio germinal pueden observarse ocasionalmente oocitos remanentes y fagocitos de la previa estación reproductiva, además de oocitos inmaduros (basófilos). Las gónadas masculinas solo pueden ser

identificadas mediante estudios histológicos. Una capa de espermatogonias está presente en el epitelio germinal. El lumen está vacío.

Maduro (III): En esta etapa los oocitos vitelogénicos son eosinófilos y Pas + y están densamente compactados en los túbulos; en algunas ocasiones los oocitos son tan abundantes dentro del túbulo que pierden su forma esférica, tomando una forma denominada “glassclocks” o de reloj de arena. Es posible que esta forma se deba a la salida de los oocitos del folículo, además, indicaría la formación de la protuberancia y la primera división meiótica. En los machos, los pliegues del epitelio germinal están reducidos o ausentes y el lumen se encuentra lleno de espermatozoides. Algunos espermatoцитos pueden estar presentes a lo largo del epitelio. La pared gonadal tiene su mínimo espesor.

Desovado (IV): La pared de los túbulos aumenta su grosor, sin embargo esta se observa más arrugada y las células del peritoneo son ligeramente cúbicas. Se pueden encontrar oocitos residuales en el lumen y fagocitos. Las gónadas masculinas presentan túbulos encogidos, y generalmente el lumen vacío o con pocos espermatozoides remanentes, mientras que las espermatogonias están dispersas a lo largo del epitelio germinal.

Teniendo en cuenta el gran desconocimiento sobre la biología reproductiva del pepino de mar, el objetivo en este capítulo fue describir la morfología gonadal y el desarrollo gametogénico de *Stichopus sp* silvestres, incluyendo el periodo de desove, la proporción de sexos, la evaluación de la sincronización de los estados

de madurez entre hembras y machos y finalmente, discernir como este conocimiento se compara con el encontrado en especies similares. El trabajo constituye un aporte significativo al conocimiento de la biología reproductiva de especies nativas del Caribe colombiano.

METODOLOGÍA

De febrero (2013) a enero (2014) se realizaron extracciones mensuales de diez pepinos de mar, los cuales fueron capturados en el sector del Rodadero de Santa Marta, Magdalena (11°13' 22,73" N - 74° 13' 32,59" O). Los organismos fueron rápidamente trasladados vivos (un individuo/L) en tanques plásticos de 20 litros con agua de mar al Laboratorio de Acuicultura de la Universidad del Magdalena. A su llegada se acondicionaron en tanques de 550L (Temperatura: 26°C; Salinidad: 36 UPS; Oxígeno: 5,36 mg/l), en donde se mantuvieron hasta el momento de su disección. Al día siguiente los individuos se sacrificaron mediante hipotermia (16°C). En total se examinaron 120 individuos durante el periodo de muestreo.

Una vez en estado letárgico, cada individuo fue ubicado sobre una bandeja donde se tomó una fotografía de registro, se midió la longitud total y se utilizó una balanza electrónica (Ohaus de 0,001 g de precisión) para conocer el peso total (PC), el peso escurrido (PE) y el peso de las gónadas (PG). Con la información obtenida se calculó el índice gonadosomático utilizando la siguiente ecuación (Abdel-Razek *et al.*, 2005):

$$IG = \left(\frac{PG}{PE} \right) \times 100$$

La disección se realizó en dirección postero-anterior (del ano hacia la boca). Para esto, los individuos se ubicaron con el área ventral hacia arriba y el corte se realizó en línea recta siguiendo la trayectoria antes mencionada (Figura 3). Durante los meses en los cuales el tamaño de la gónada fue pequeña (peso ≤ 1 g), se analizó todo el material gonadal, pero en los meses en los cuales la gónada tenía un mayor tamaño (peso > 1 g), se seleccionó una porción específica para el análisis histológico (Figura 4). Inmediatamente, las gónadas se fijaron en formol neutro al 10%, se deshidrataron en gradientes de etanol y se incluyeron en parafina; posteriormente fueron cortados con un micrótopo (Sakura ref Accu-cut SRM) a 5 micras de espesor, y los cortes se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E) (Drury y Walington, 1980). Se utilizó un microscopio con cámara marca Carl Zeiss para observar los cortes histológicos y realizar un registro fotográfico de los estadios gametogénicos. Para medir el diámetro de los túbulos gonadales y el diámetro de los ovocitos de las hembras se utilizó el software AxioVision 4.8.2.

La determinación del sexo, estadio de madurez y ocurrencia de eventos reproductivos se asignó usando la clasificación determinada por Ramofafia *et al.* (2000), Fajardo-León *et al.* (2008) y Ramos-Miranda *et al.* (2012), basada en criterios de forma, color y longitud de la gónada y las características microscópicas de los oocitos y el esperma.

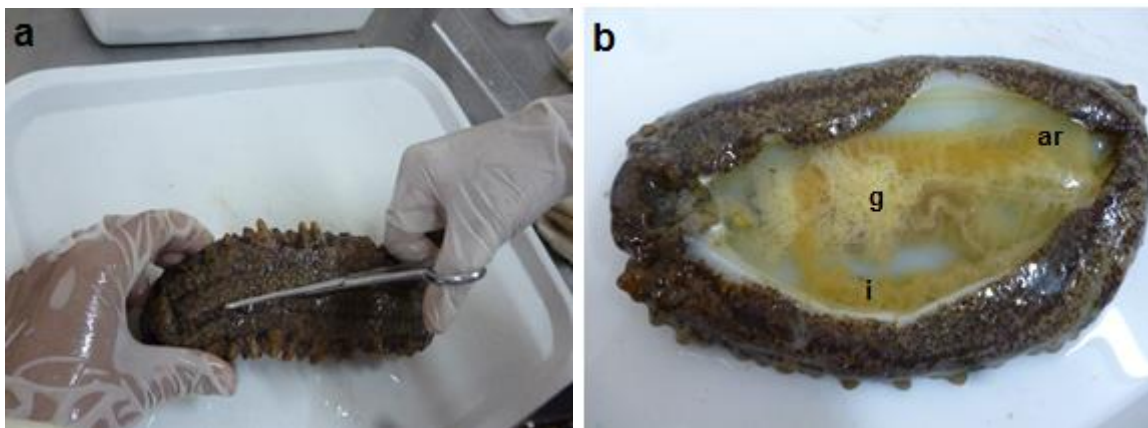


Figura 3. Disección de los individuos de *Stichopus* sp. a) Corte ventral transversal en dirección posterior-anterior, b) Morfología interna: i, intestino, ar, árbol respiratorio y g, gónada.

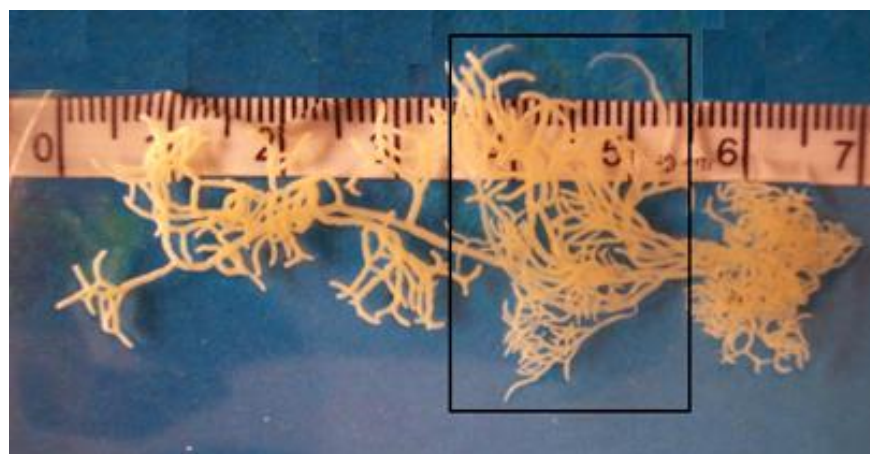


Figura 4. Fragmento de tejido gonadal utilizado para el procesamiento histológico.

Análisis de datos

Los datos obtenidos del índice gonadosomático mensual se analizaron mediante una ANOVA simple en el programa Statgraphics utilizando como factor los diferentes meses del año y como variable de respuesta el valor del índice obtenido

en cada uno de los meses. Para determinar las diferencias significativas del índice durante los meses analizados, se aplicó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis (H), después de verificar que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0.05$) y homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS

Los individuos muestreados tuvieron un peso promedio y desviación estándar de 271.25 ± 84.93 g; mientras su peso escurrido promedio fue de 233.67 ± 78.10 g. En el peso por sexo no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), las hembras tuvieron un peso promedio de 236.91 ± 82.40 , mientras que en los machos fue de 237.65 ± 74.87 g.

Stichopus sp. es una especie gonocórica que carece de dimorfismo sexual externo; posee una gónada bifurcada unida al mesenterio dorsal, localizada a cada lado en la parte anterior del cuerpo (Figura 5a). La gónada está constituida por numerosos túbulos ramificados unidos mediante un tejido conectivo principal, a una base gonadal que termina en el gonoporo, el cual está ubicado en la parte dorsal anterior. La coloración de las gónadas difiere según el sexo; las hembras siempre presentaron una coloración en tonos crema-amarillo, mientras que los machos tenían gónadas de color blancuzco.

La proporción de la gónada con respecto al cuerpo varió durante los meses evaluados, se observó un aumento paulatino del tamaño y distribución, lo que está relacionado con el grado de desarrollo (Figura 5b y c).

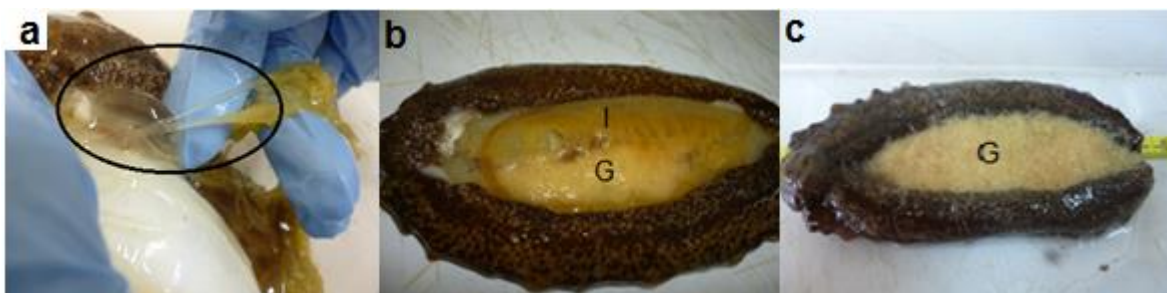


Figura 5. Hembra de *Stichopus* sp. a) Conexión gonadal hacia el poro germinal; b) Individuo con intestino diferenciado (I) y gónada (G) en crecimiento; c) Individuo completamente maduro.

Durante los meses muestreados se pudieron observar algunas diferencias en cuanto a color y tamaño de los túbulos gonadales para ambos sexos: las gónadas de las hembras presentaron siempre una coloración cremosa a amarilla y sus túbulos eran de mayor tamaño, alcanzando un diámetro de $405.07 \pm 48.19 \mu\text{m}$ (Figura 6), mientras que en los machos siempre se encontraron túbulos más delgados con un diámetro de $272.18 \pm 56.37 \mu\text{m}$ y una coloración blancuzca (Figura 7). En la mayoría de los meses observados estos caracteres fueron permanentes en casi todos los individuos, aunque en algunas ocasiones se evidenciaron dos coloraciones, las cuales permitieron inferir un carácter de identificación de estado de desarrollo gametogénico. Esta característica fue corroborada posteriormente con el análisis histológico; en aquellos casos en los que se observó una fracción gonadal de color café contigua a la coloración normal correspondieron a túbulos en proceso

de fagocitosis; mientras que los demás túbulos presentaron gametos en estado de desarrollo según el mes y periodo.

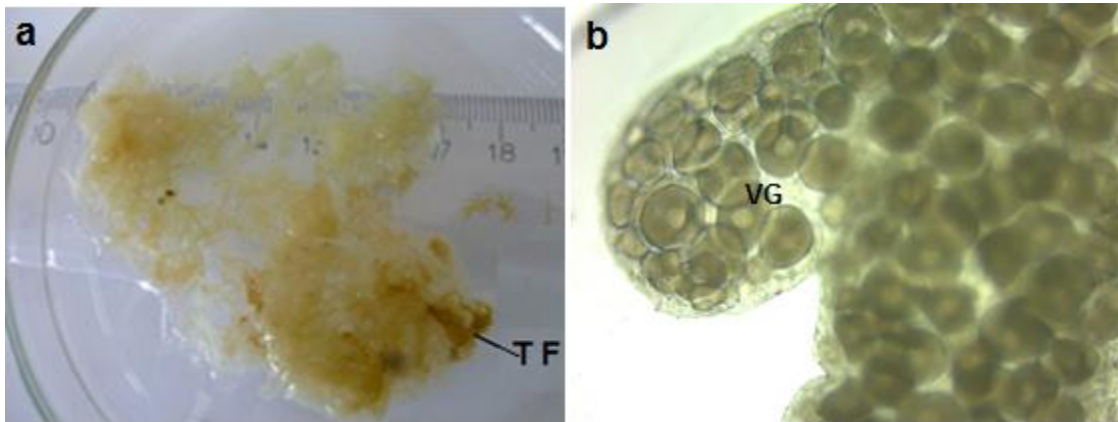


Figura 6. Gónadas femeninas de *Stichopus* sp. a) Vista macroscópica de los túbulos con fagocitos (TF), b) Microscopía de luz que muestra ovocitos “en fresco”, en proceso de crecimiento y vesícula germinal (VG) claramente diferenciada.

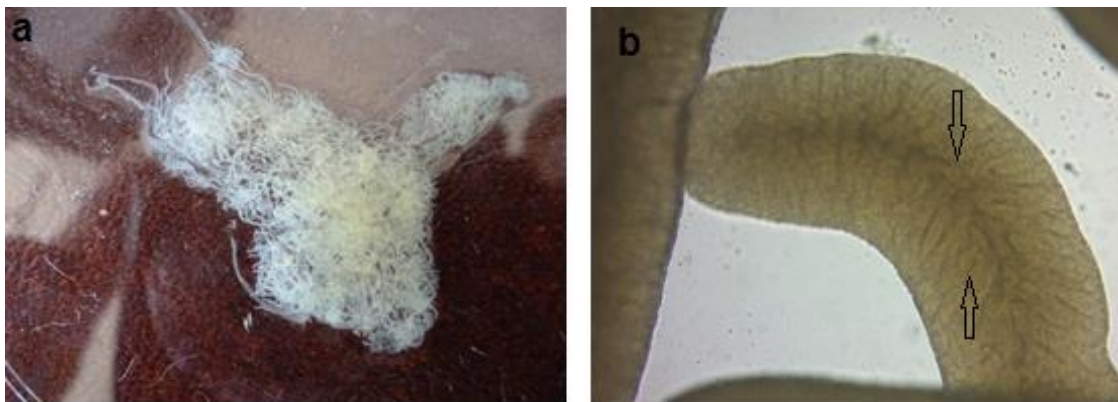


Figura 7. Gónadas masculinas de *Stichopus* sp. a) Vista macroscópica; (b) Microscopía de luz en la que se aprecian cortes “en fresco” de los canales seminíferos dirigidos hacia el lumen (flecha).

Proporción de Sexos

De los 120 individuos examinados el 51.3 % fueron machos, el 43.3% eran hembras y el 5.4 % no pudo ser diferenciado debido a que no tenían gónada. La

proporción macho:hembra mensual fue variada durante el periodo muestreado; en los meses de febrero, agosto y octubre los machos tuvieron una relación de 1:2.33 con respecto a las hembras; durante los meses de marzo, mayo, junio y noviembre la relación se mantuvo 1:1; mientras que en los meses de abril, julio, septiembre y diciembre se registró una mayor proporción de machos (Figura 8). La proporción sexual total obtenida durante el periodo de muestreo no fue significativamente diferente de la distribución esperada ($\chi^2 = 0.314$; g.l. = 44 ; $P < 0.05$), por lo tanto la proporción de sexos no difiere de 1: 1.

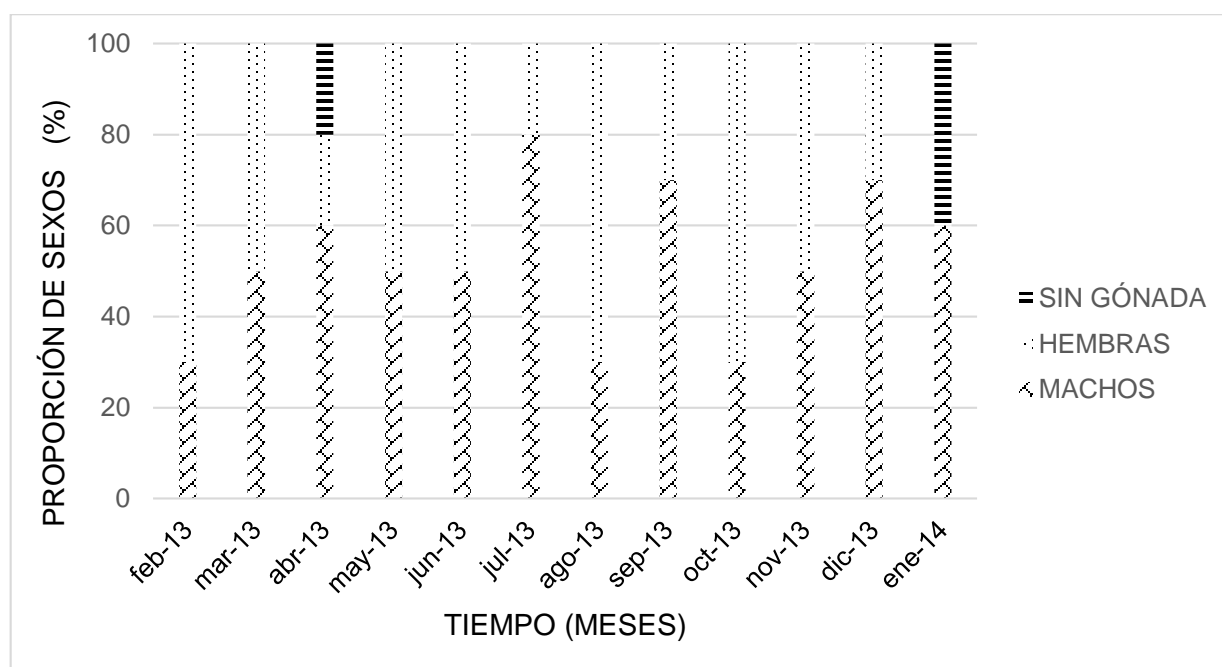


Figura 8. Proporción de sexos de *Stichopus* sp. durante un año de muestreo (Febrero/2013 a Enero/2014). n = 120. ($\chi^2 = 0.314$, $P < 0.05$).

Descripción del ciclo reproductivo

Índice gonadosomático

Los valores máximos del índice gonadosomático se observaron cuando la gónada se encontraba madura; mientras que en los periodos de reposo y post desove se generaron los valores más bajos debido a la reducción de su tamaño. Los valores del índice gonadosomático más altos se observaron durante los meses de Julio a Noviembre. El pico reproductivo se registró en el mes de octubre con un valor promedio de 8.72 ± 4.4 . El análisis estadístico por meses mostró que existen diferencias significativas en este factor durante los diferentes meses muestreados ($P < 0.05$), y se evidenció una relación entre los meses de agosto a noviembre; mientras que durante los demás meses no se encontró relación entre estos valores (Figura 9).

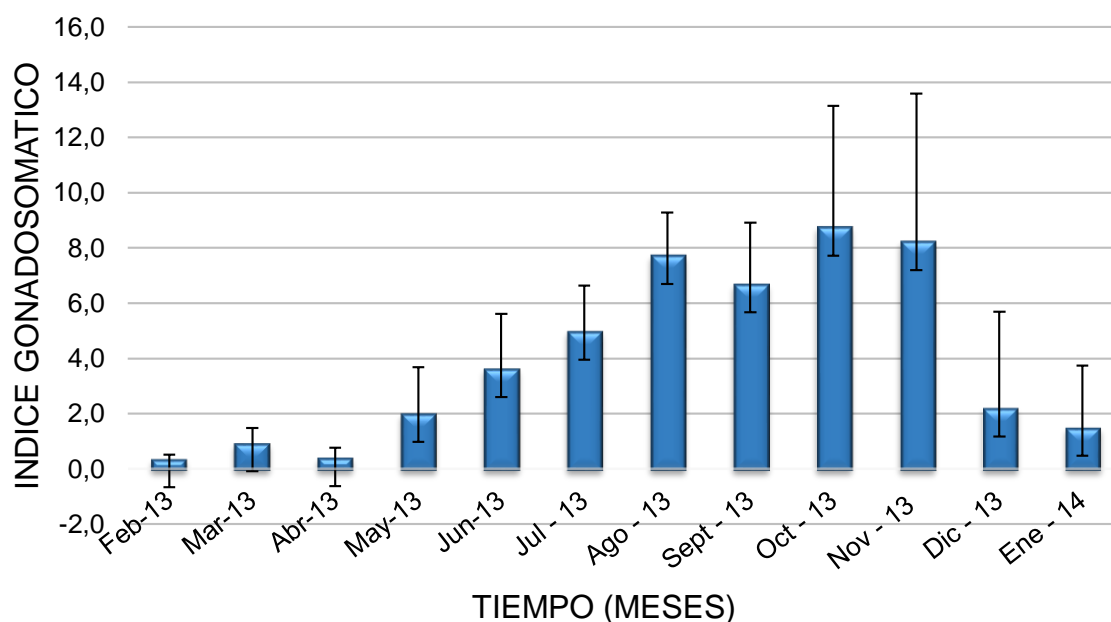


Figura 9. Índice gonadosomático mensual de *Stichopus* sp., con la desviación estándar (DS) n = 120. (Febrero/2013 a Enero/2014).

En el análisis por sexo, el índice gonadosomático presentó una tendencia similar. Los machos mostraron IG con valores entre 0.08 a 16.17 y las hembras en un intervalo de 0.06 a 18.48. Al analizar los valores con base en los indicadores por sexos no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre machos y hembras, lo que indica un desarrollo gonadal sincrónico.

La caracterización del ciclo reproductivo se inició en febrero de 2013, cuando los valores del IG eran los más bajos y éstos secuencialmente fueron aumentando. A partir de julio se evidenció un aumento significativo señalando el inicio de la maduración. Esta tendencia se mantuvo para las hembras hasta el mes de octubre cuando empezó a decrecer rápidamente; mientras que los machos mostraron un bajo valor del IG entre septiembre y octubre, que aumentó en noviembre, luego de lo cual descendió abruptamente, tal como se observa en la Figura 10.

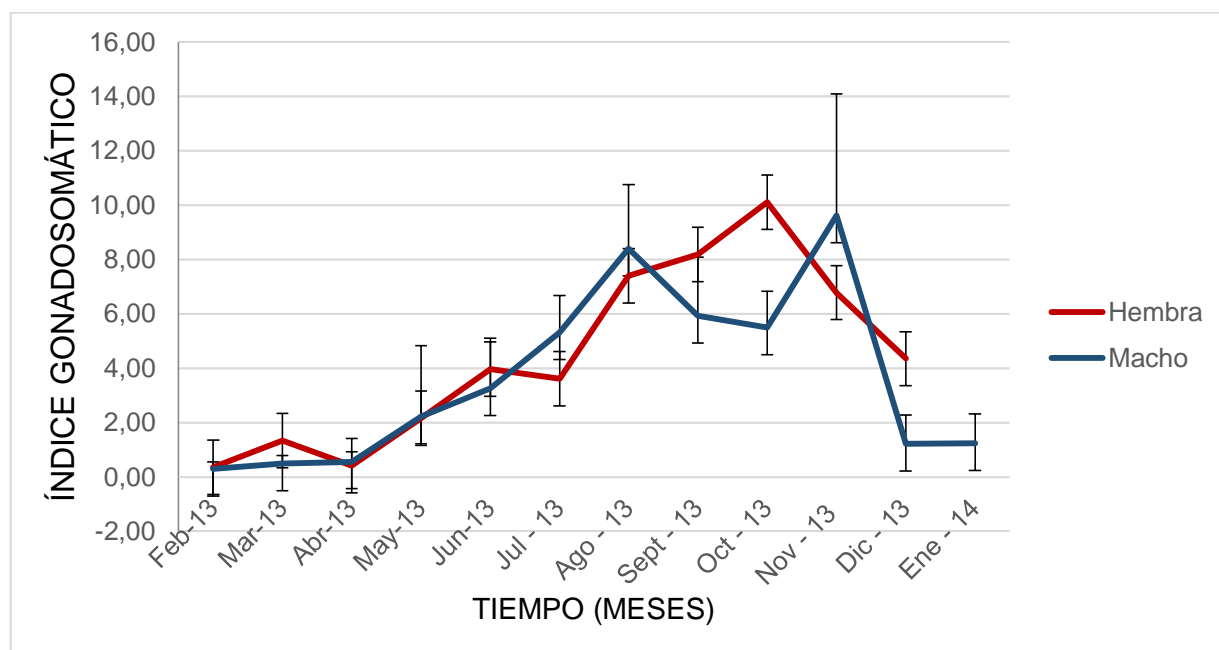


Figura 10. Índice gonadosomático por sexo de *Stichopus* sp. (Febrero/2013 a Enero/2014). n = 120.

Histología gonadal

El análisis histológico de las gónadas y el índice gonadosomático mostraron un patrón anual de desarrollo gonadal para ambos sexos, permitiendo distinguir un ciclo completo. Con base en las características morfológicas e histológicas observadas, se identificaron y describieron los estadios de desarrollo gonadal para hembras y machos de la siguiente forma:

Oogénesis

En hembras se observaron 5 fases de desarrollo gonadal: Recuperación, crecimiento, maduro, parcialmente desovado y postdesove.

Recuperación. La pared del túbulo gonadal es gruesa y se encuentra tapizada por un epitelio exterior o celómico, que en este estudio es apreciable en la mayoría de las fases del desarrollo gonadal. Se observan ovocitos inmaduros situados en la periferia de la gónada, en la capa germinal, los cuales presentan un citoplasma basófilo y un núcleo eosinófilo con un nucléolo periférico. El tamaño promedio de estos ovocitos fue de $30.14 \pm 10,9 \mu\text{m}$. Este estado se encontró durante el mes de febrero (Figura 11 a, b).

Crecimiento. El espesor del tejido conectivo que bordea los túbulos gonadales se hace más delgado. Al interior del lumen, en el epitelio germinal se observan escasos ovocitos inmaduros basófilos y en el centro se aprecian abundantes ovocitos

previtelogénicos y vitelogénicos, en donde se distingue un amplio citoplasma basófilo y un núcleo central eosinófilo, dentro del que se sitúa un nucléolo periférico (Figura 11 c). El tamaño de estas células oscila entre 70.5 y 98.42 μm . Este estadio estuvo presente durante los meses de marzo a julio.

Maduro. Se observan túbulos anchos y se aprecia una reducción en el grosor de paredes del tejido gonadal, haciéndose a su vez, casi imperceptible el epitelio celómico. Los túbulos están completamente llenos de ovocitos maduros, conformados por un abundante citoplasma eosinófilo, un núcleo grande y un nucléolo situado en posición central o periférica, soportados en una capa fina de tejido conectivo; en la periferia de la gónada (epitelio germinal), se aprecian escasos ovocitos inmaduros. El tamaño de los ovocitos maduros fue de $125.24 \pm 13.11 \mu\text{m}$. Este estadio de desarrollo se encontró desde junio hasta noviembre (Figura 11 d).

Parcialmente desovado.

Se observan túbulos gonadales con abundantes ovocitos maduros, entremezclados con áreas vacías que evidencian la expulsión de los ovocitos durante el desove. Este estado es muy común durante los meses de desove encontrados en este estudio (agosto a diciembre), y que se manifiesta previo a la aparición de los fagocitos, los cuales se alimentan de ovocitos residuales (Figura 11 e).

Post-desove. La pared tubular es delgada y está compuesta por tejido conectivo, rodeado por células escamosas y un evidente epitelio celómico. Al interior del órgano se observan escasos ovocitos residuales basófilos, que presentan diferentes

grados de deterioro; en esta fase, aparecen fagocitos dentro del área delimitada por los restos de membrana vitelina que rodean los ovocitos. Este estado se encontró durante los meses de febrero, agosto, septiembre y noviembre (Figura 11 f).

MACHOS

Espermatogénesis

Las gónadas masculinas se caracterizan por presentar 4 fases de desarrollo gonadal: Recuperación, crecimiento, maduro y postdesove.

Recuperación. Se observa una pared tubular gruesa compuesta de una capa fina de tejido conectivo con abundantes capas de tejido germinal a partir de las cuales se generan células espermáticas primarias, de coloración basófila, circulares, de tamaño homogéneo. El lumen tubular (L) se encuentra vacío y no se aprecian espermatozoides únicamente durante el mes de abril (Figura 12 a).

Crecimiento. Se observa una fina capa de tejido conjuntivo que rodea los túbulos espermáticos. En las figuras 12b y 12c se aprecian abundantes células espermáticas (espermátides, espermatoцитos), organizados de forma centrípeta, es decir, desde la periferia hacia el lumen y a modo de “laberinto”. Este estado se registró durante los meses de marzo a julio.

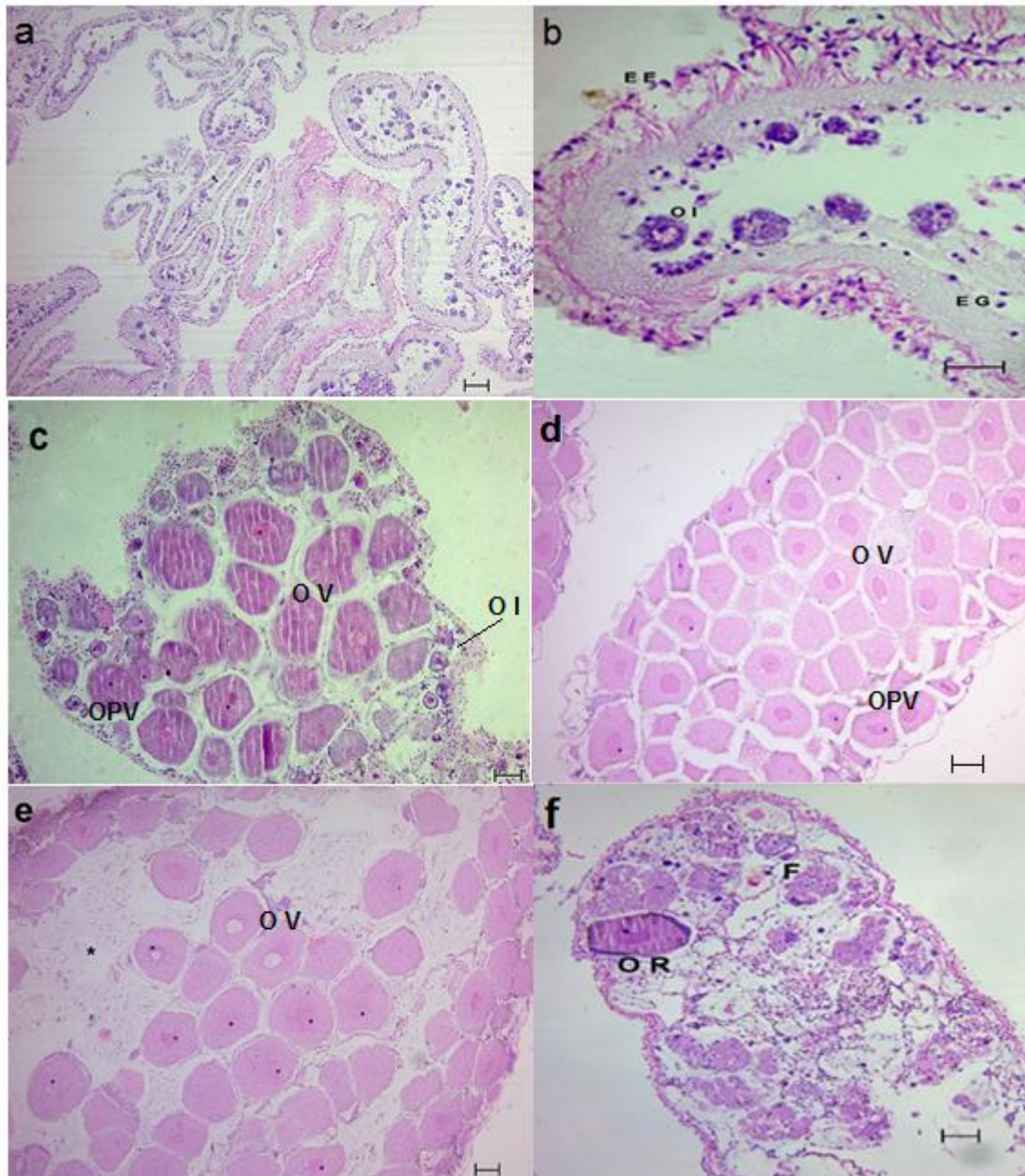


Figura 11. Histología del desarrollo gonadal de hembras de *Stichopus* sp. a) Recuperación. 10X; b) Recuperación. Se observa el epitelio exterior (EE), el epitelio germinal (EG) y ovocitos inmaduros (OI), basófilos. 40X; c) Crecimiento. Con abundantes ovocitos inmaduros (OI) y otros en estados de desarrollo previtelogénico (OPV) y vitelogénico (OV), marcadamente eosinófilos. 10x; d) Maduro. Se aprecian abundantes ovocitos previtelogénicos (OPV) y vitelogénicos (OV), que contienen una gran vesícula germinal. e). Parcialmente desovado. Muestra folículos vacíos (*) y ovocitos vitelogénicos (OV), con su vesícula germinal y un nucléolo periférico. f) Postdesove. Muestra un tejido deteriorado, con ovocitos remanentes (OR), basófilos y presencia de abundantes fagocitos (F) (febrero a diciembre/2013). La barra equivale a 20µm. H-E.

Maduro. En la gónada se aprecian pequeñas células situadas en posición centrípeta en el lumen tubular, las cuales se identifican como espermatozoides maduros. La pared tubular es lisa, y en su periferia se sitúan numerosos espermatoцитos; este estado se encontró durante los meses de julio a diciembre (Figura 12d).

Post-desove. El lumen del túbulo está prácticamente vacío y libre de espermatozoides. La pared del túbulo muestra algunas invaginaciones, propias del epitelio germinal, y se evidencia el paso de los espermatozoides por el lumen hacia el exterior, presente durante los meses de diciembre a febrero (Figura 12e).

La mayoría de las hembras durante el mes de febrero se encontraban en estado de postdesove, mientras una leve porción (33.4 %) estaba en estado de recuperación. A partir del mes de marzo se inició el estado de crecimiento el cual se mantuvo en todos los individuos muestreados durante los dos meses siguientes. Entre junio y agosto se empezaron a observar hembras en maduración indicando el inicio del periodo reproductivo. En junio se presentó una mayor proporción de hembras maduras (60%) y en el porcentaje restante se evidenció el estado de crecimiento; mientras que durante julio los individuos muestreados estuvieron representados con un 50% para los estados de maduración y crecimiento. En el mes de agosto se observan hembras parcialmente desovadas (50%), en postdesove (16.7%) y maduras (33.3%). En septiembre únicamente se encontraron en estado de postdesove y parcialmente desovadas, y en octubre nuevamente se presentaron individuos en maduración y parcialmente desovados en igual proporción (50%). En

noviembre se presentaron los estados de desove parcial (60%), maduro (20%) y postdesove (20%) y en diciembre se repitió la misma situación que en septiembre (Figura 13).

Por otro lado los machos mostraron un periodo reproductivo marcado por la presencia de individuos maduros de julio a diciembre, presentando en el mes de agosto su mayor pico reproductivo con un 100% de individuos maduros. Únicamente en febrero y diciembre de 2013 y enero de 2014 se observó que todos los individuos estaban en postdesove. El estado de crecimiento estuvo presente en casi todos los meses asociado al estado maduro y llegando a estar presente en un 100% de los individuos muestreados en junio. El estado de recuperación únicamente se encontró en el mes de abril con un 16.7% (Figura 14).

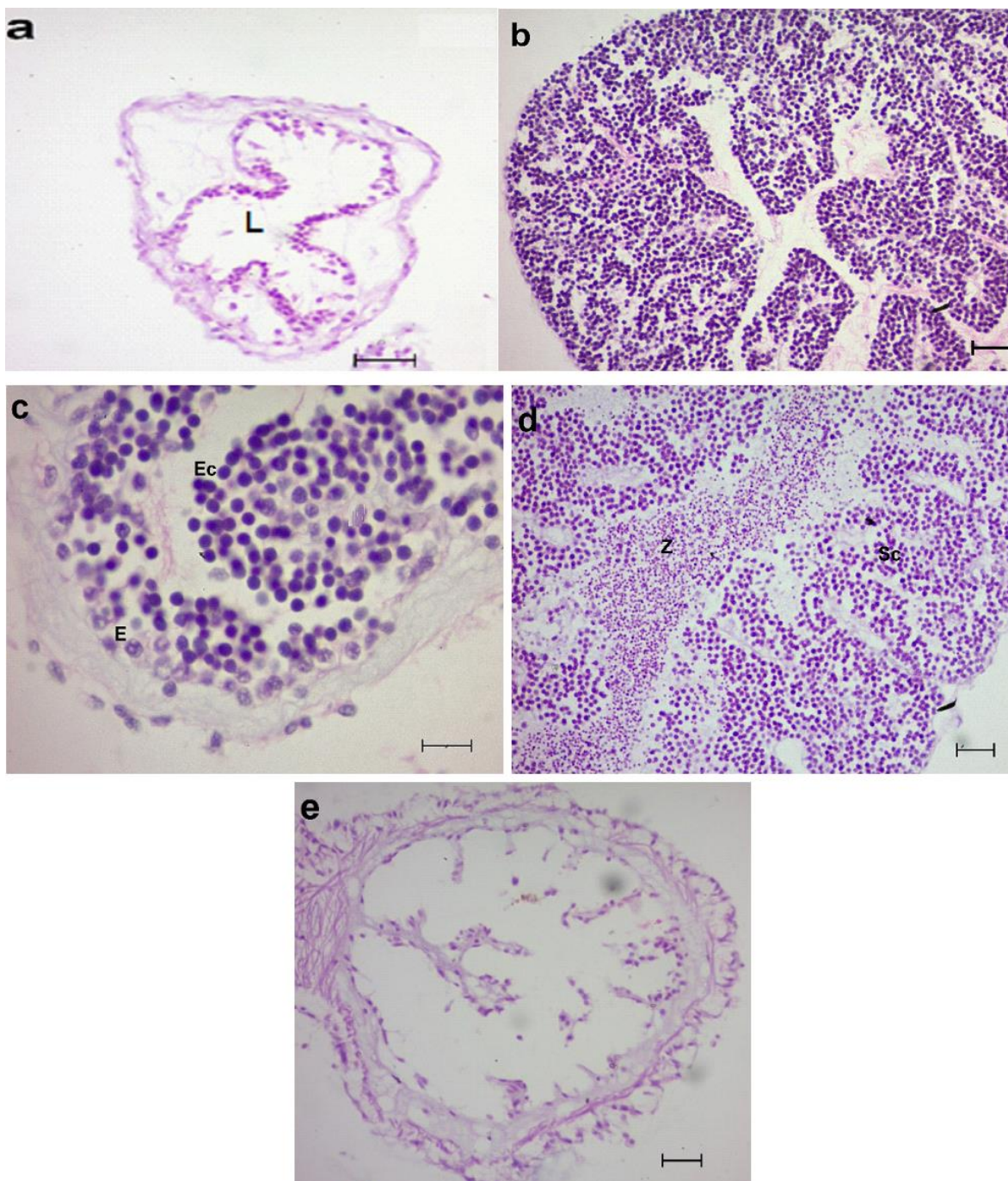


Figura 12. Histología del desarrollo gonadal de machos de *Stichopus* sp. a) Recuperación. Se observa una capa gruesa de tejido conectivo y capas de tejido germinal basófilas. Lumen vacío. 40x; b) Crecimiento. Fina capa de tejido conectivo que circunda los túbulos espermáticos 40x, en el que se aprecian fácilmente abundantes espermatogonias (E) y espermatocitos (Ec) revelados en la fotografía 4 (c) 100x. d) Maduros. En el lumen tubular se sitúan espermatozoides (Z) listos para ser liberados. En el folículo seminal se observan abundantes espermatocitos (Sc). 10x. e) Postdesove. Folículo seminal vacío. Pared tubular con epitelio germinal. 40x. (febrero/2013 a enero/2014). La barra equivale a 20μm. H-E.

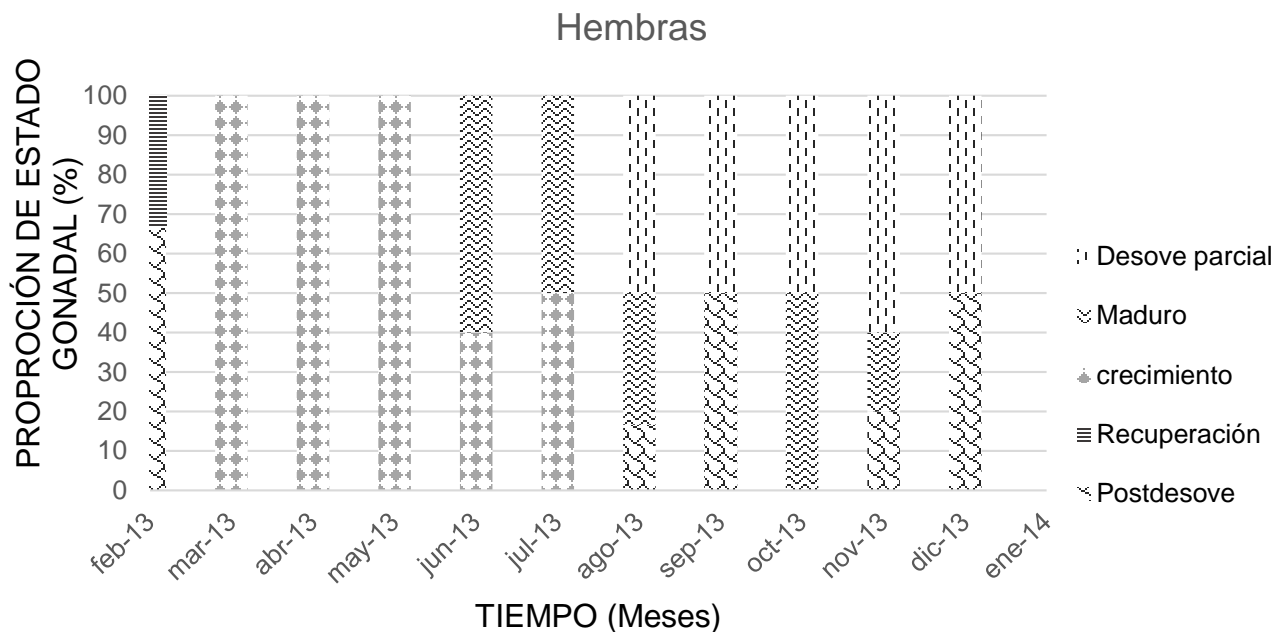


Figura 13. Frecuencia de desarrollo gonadal de las hembras de *Stichopus* sp. (Febrero/2013 a Enero/2014). n = 120.

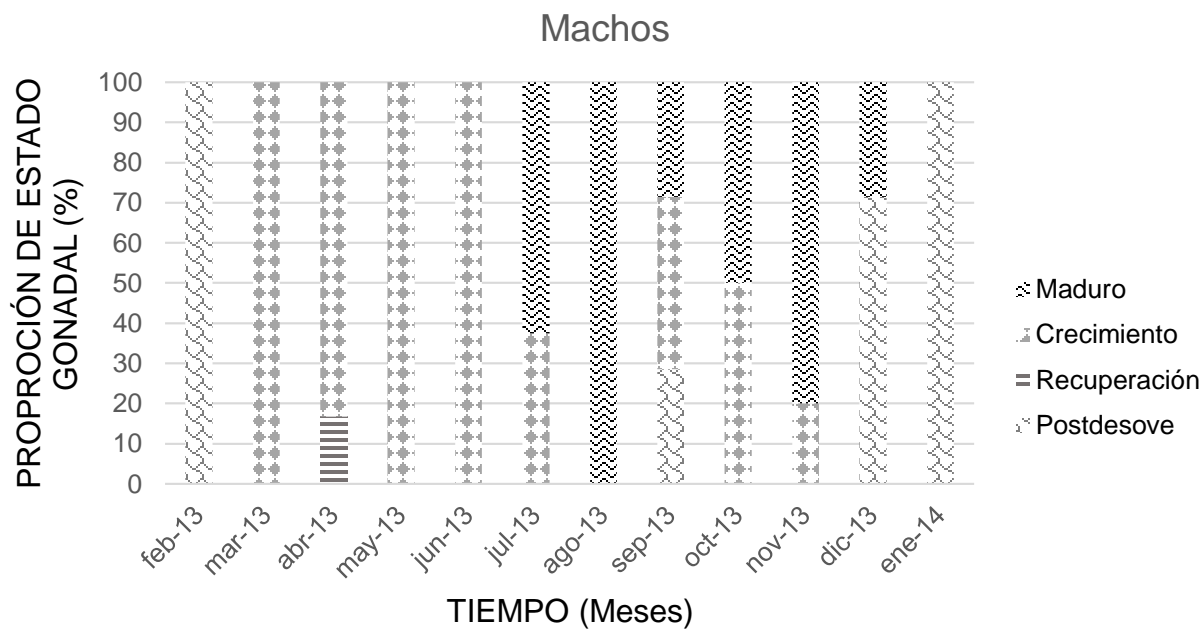


Figura 14. Frecuencia de desarrollo gonadal de los machos de *Stichopus* sp. (Febrero/2013 a Enero/2014). n = 120.

DISCUSIÓN

La proporción de sexos estimada para *Stichopus* sp. no difiere de manera significativa de 1:1, resultado que coincide con lo reportado para *Isostichopus badionotus* y *Holothuria mexicana* (Guzmán *et al.*, 2003), *I. fuscus* (Herrero-Pérezul *et al.*, 1999) y para *H. spinifera* (Asha y Muthiah, 2008). Diversos estudios realizados afirman que esta proporción es característica de especies holotúridas con reproducción sexual (Conand, 1993; Herrero-Perezrul *et al.*, 1999).

Los túbulos gonadales estuvieron presentes en la mayoría de los individuos muestreados durante todo el año y no fueron absorbidos después del desove; la ausencia de túbulos solo fue apreciable en cinco individuos que representan un 4.16% de la población total muestreada. Estudios realizados por otros autores como Herrero-Pérezrul *et al.* (1999) afirman que la ausencia de las gónadas puede estar asociada a los procesos de evisceración, pero en este caso no se registró alguna evidencia que permitiera inferir esta situación debido a que todos los órganos estaban presentes, excepto las gónadas.

Durante el seguimiento histológico del desarrollo de la gónada no se registró un estadio de reabsorción; esta misma situación se ha visto en otras especies de pepino de mar como *H. leucospilota* (Ong Che, 1990), *H. fuscogilva* y *A. mauritiana* (Ramofafia *et al.*, 2000, 2001). Hamel *et al.* (1993), sugieren que la presencia de los fagocitos inhibe la reabsorción de los túbulos gonadales; por esta razón el modelo de reclutamiento de túbulos (MRT) propuesto por Smiley (1988) no puede ser aplicable a *Stichopus* sp.

El diámetro de los túbulos en las hembras fue mayor que en los machos, lo cual fue similar a lo reportado para *H. fuscogilva*, *H. nobilis*, *H. fuscopunctata*, *H. scabra*, *H. atra*, *Actinopyga mauritana*, *Actinopyga echinites* (Conand, 1993) y *H. spinifera* (Asha y Muthiah, 2008). Esto obedece a que los ovocitos tienen un mayor volumen que los espermatozoides. A su vez, el tamaño de los ovocitos estuvo asociado a su estado de desarrollo: los ovocitos inmaduros y previtelogénicos oscilaron entre 12.9 – 58.7 µm y 58.6 – 124 µm respectivamente, con resultados similares a lo reportado para *H. sanctori* (Navarro *et al.*, 2012); mientras que el tamaño de los ovocitos maduros osciló entre 130 y 162 µm, lo cual resultó parecido a lo reportado en otros Aspidochirotidos como *H. spinifera* con 148 µm (Asha y Muthiah, 2008) y *A. echinites* con 149 µm (Conand, 1993). Según Conand (1993), el tamaño de los ovocitos es un indicador del desarrollo de las larvas, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en este estudio, considerando que los ovocitos maduros de las especies del orden Aspidochirotida varían entre 150 y 210 µm y su desarrollo es planctónico como ocurre en *Stichopus* sp.

El análisis de las células gametogénicas y su relación con el espesor del tejido que reviste los túbulos gonadales en los miembros de la familia Holothuridae, facilita la caracterización gonadal, debido a que durante la gametogénesis se evidencia un patrón de oscilación del tamaño del epitelio gonadal como respuesta a la maduración de los gametos (Cameron y Fankboner, 1986). Por esta razón este estudio se realizó teniendo en cuenta la presencia y el tamaño de las células gametogénicas y el espesor de los tejidos germinal y exterior. Para las hembras de *Stichopus* sp. se describieron cinco estados de desarrollo (recuperación,

crecimiento, maduro, parcialmente desovado y postdesove); mientras que en los machos solo se describieron cuatro estados (recuperación, crecimiento, maduro y post-desove). En ambos sexos se logró observar como el tamaño del epitelio exterior estuvo asociado al desarrollo gonadal, presentando un mayor tamaño durante el estadio de recuperación y disminuyendo secuencialmente hasta no estar presente durante las fases de maduración y el postdesove. Según Ramofafia *et al.* (2003), el aumento del epitelio exterior durante el estado de recuperación y su posterior reducción durante el proceso de maduración, evidencia que este puede ser el sitio de almacenamiento de nutrientes para la actividad metabólica. El examen microscópico de las gónadas mostró que en la etapa de madurez, las paredes de las gónadas tienen el mínimo espesor y el lumen está completamente lleno de gametos, como lo registrado en otras especies (Asha y Muthiah, 2008; Ghobadyan *et al.*, 2012).

Autores como Foglietta *et al.* (2004) han descrito cinco estados de desarrollo gametogénico para *I. badionotus*; de forma similar este estudio describe cinco estados pero difiere en uno de ellos registrando el estado de parcialmente desovado y no el de crecimiento avanzado. En este sentido, Herrero-Pérezrul *et al.* (1999) y Navarro *et al.* (2012), han registrado para *I. fuscus* y *H. sanctori* el estado de parcialmente desovado. Los autores mencionan que la presencia de los gametos maduros en las gónadas femeninas, expulsadas de manera parcial, permiten identificar una estrategia reproductiva de los holotúridos, con lo cual pueden desovar más de una vez durante el periodo reproductivo y de esta forma maximizar el éxito

de la reproducción, tal como ocurre en *Stichopus*. sp. del presente estudio, donde se constató que éstos pueden presentar varios desoves durante un mismo periodo reproductivo, manifestado en un desarrollo del ovario sincrónico por grupos.

Por otra parte, la fluctuación del IG durante el periodo de muestreo reveló un aumento significativo durante los meses de julio a noviembre con un pico en el mes de octubre, indicando que *Stichopus* sp. es una especie con ciclo anual con una temporada de desove durante los meses más cálidos del año. Autores como Smiley *et al.* (1991), consideran que esta adaptación o preferencia reproductiva hacia los meses cálidos, está relacionada con la temperatura del mar y la disponibilidad de alimento para el desarrollo de las larvas planctónicas. Esta misma situación fue encontrada para *Isostichopus badionotus* (Herrero-Pérezrul *et al.*, 1999 y Foglietta *et al.*, 2004; Zacarías-Soto *et al.*, 2010).

La relación entre el IG y el desarrollo gonadal confirma que esta especie tiene un periodo reproductivo determinado durante el segundo semestre del año; esta situación es común en la mayoría de los holotúridos Aspidochirotidos de zonas templadas y tropicales (Hyman, 1955; Smiley *et al.*, 1991; Guzmán *et al.*, 2003; Zacarías-Soto *et al.*, 2013) y la especie tiende a tener un ciclo de reproducción anual con desove en los meses cálidos.

CONCLUSIONES

Stichopus sp. es una especie dioica sin dimorfismo sexual externo, que presenta un ciclo de desarrollo gametogénico anual diferenciado en cada sexo, cuya proporción es 1:1.

La observación de parámetros microscópicos gonadales se constituye en una herramienta útil para apoyar los procesos de reproducción al interior del laboratorio.

Las hembras presentan cinco estados de desarrollo gonadal (postdesove, recuperación, crecimiento, maduro y parcialmente desovado); mientras que en los machos solo existen cuatro estados (recuperación, crecimiento, maduro y post-desove).

Es probable que la maduración gonadal esté influenciada por la temperatura del agua, situación que debe comprobarse en laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Razek, F. A., Abdel-Rahman, S. H., El-Shimy, N. A., & Omar, H. A. (2005). Reproductive biology of the tropical sea cucumber *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Red Sea coast of Egypt. *Egyptian. J. Aqua. Res*, 31(2), 383-402.

Agudelo, V & Rodríguez A. (2013). Pepino de mar: Una alternativa para la maricultura en Colombia. *Infopesca Internacional*, 49, 22-26

Agudo, N. (2006). *Sandfish hatchery techniques*. Secretariat of the Pacific Community.

Álvarez, L. R., & Ramón, L. (1981). Listado preliminar de los equinodermos de la costa Atlántica colombiana. *Boletín Museo del Mar*, 10, 24-39.

Anderson, E. N. (1988). *The food of China*. Yale University Press.

Asha, P. S., & Muthiah, P. (2008). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. *Aquaculture International*, 16(3), 231-242.

Asha, P. S., & Muthiah, P. (2005). Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. *Aquaculture*, 250(3), 823-829.

Battaglione, S. C. (1999). Culture of tropical sea cucumbers for stock restoration and enhancement. *Naga, The ICLARM Quarterly*, 22(4), 4-11.

Battaglione, S. C., Seymour, J. E., & Ramofafia, C. (1999). Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra*. *Aquaculture*, 178 (3), 293-322.

Bayer, F. M., Voss, G. L., & Robins, C. R. (1970). Bioenvironmental and Radiological Safety Feasibility Studies, Atlantic-Pacific Interoceanic Canal: Report on the Marine Fauna and Benthic Shelf-slope Communities of the Isthmian Region. University of Miami, Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Sciences.

Borrero-Pérez, G. H., Benavides-Serrato, M., Solano, O. D., & Navas, G. R. (2003). Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) recolectados en el talud continental superior del Caribe colombiano.

Cameron, J. L., & Fankboner, P. V. (1986). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata: Holothuroidea). I. Reproductive periodicity and spawning behavior. *Canadian Journal of Zoology*, 64(1), 168-175

Caycedo, I. E. (1978). Holothurioidea (Echinodermata) de aguas someras en la costa norte de Colombia. *An. Inst. Inv. Mar. Punta Betín* (10), 149-198.

Caycedo, I. E. (1979). Observaciones de los Equinodermos en las Islas del Rosario. *An. Inst. Inv. Mar. Punta Betín* (11), 39-47.

Chen, J. (2003). Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC -de-mer Information Bulletin*, 18, 18-23.

Conand, C. *Bêche* (1993). Reproductive biology of the holothurians from the major communities of the New Caledonian Lagoon. *Marine Biology*, 116(3), 439-450.

Conand, C. (2006). Sea cucumber biology, taxonomy, distribution and conservation status. En: Bruckner A.W. (Eds.) *Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae*. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-34, USA. 33–50.

Conand, C. (2008). Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Africa and Indian Ocean. *Sea cucumbers: a global review of fisheries and trade*, 153-205.

Conand, C. & Byrne, M. (1993). A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries. *Marine Fisheries Review*, 55(4), 1-13.

Drury, R.A.B. & Wallington, E.A. (1980). Carleton's Histological Techniques. Oxford: Oxford University Press. 220p.

Enquin, Z. (1988). Chinese Medicated Diet. Publishing House of Shanghai College. Shanghai.

Fajardo-León, M.C., Michel-Guerrero, E., Vélez-Barajas, J.A., Massó-Rojas, J.A., & Singh-Cabanillas J. (1995). Estructura poblacional y ciclo reproductor del pepino de

mar *Isostichopus fuscus* (Ludwing 1875) en Santa Rosalía, Baja California Sur, México. *Ciencias Pesqueras*, 11(1), 45-53.

Fajardo-León, M. C., Suárez-Higuera, M. C. L., del Valle-Manriquez, A., & Hernández-López, A. (2008). Reproductive biology of the sea cucumber *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea) at Isla Natividad and Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 34(2), 165-177.

Foglietta, L. M., Camejo, M. I., Gallardo, L., & Herrera, F. C. (2004). A maturity index for holothurians exhibiting asynchronous development of gonad tubules. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 303(1), 19-30.

Ghiselin M.T. (1987). Evolutionary aspects of marine invertebrate reproduction, in: Reproduction of marine invertebrates, general aspects, Giese A.C., Pearse J. and Pearse V. eds. Boxwood press, 609-665

Giese, A.C., Pearse, J.S., Pearse, V.B., 1991. Reproduction of marine invertebrates. In: Echinoderms and Lophophorates, Vol. VI, The Boxwood Press, Pacific Grove, CA

Giraspy, D. A. B., & Ivy, G. (2005). Australia's first commercial sea cucumber culture and sea ranching project in Hervey Bay, Queensland, Australia. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 21, 29-31.

Ghobadyan, F., Morovvati, H., Ghazvineh, L., & Tavassolpour, E. (2012). An investigation of the macroscopic and microscopic characteristics of gonadal tubules in the sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Persian Gulf, Iran). *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 32, 6-14.

González D., Navas G. y Solano O. 2002. Equinodermos colectados por la expedición CIOH-INVEMAR-SMITHSONIAN entre Cartagena y el Golfo de Urabá (29-380 m), Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 31, 85-132.

Gouyon P.-H., Maurice, S., Reboud X. & Tiii-Bottraud I. (1993). Le sexe pour quoi faire? *La Recherche* 250, 70-76.

Guzmán, H., Guevara, C., & Hernández, I. (2003). Reproductive cycle of two commercial species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from Caribbean Panama. *Marine Biology*, 142(2), 271-279.

Hamel, J. F., Himmelman, J. H., & Dufresne, L. (1993). Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). *The Biological Bulletin*, 184(2), 125-143.

Hamel, J. F., & Mercier, A. (1996). Evidence of chemical communication during the gametogenesis of holothuroids. *Ecology*, 1600-1616.

Hamel, J. F., Hidalgo, R. Y., & Mercier, A. (2003). Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 18, 3-8.

Herrero-Pérezrul, M. D. (1994). *Estudio comparativo de la reproducción de Isostichopus fuscus (Ludwig, 1875) y Neothyone gibbosa Deichmann, 1941 (Echinodermata: Holothuroidea)*, en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Herrero-Pérezrul, M. D., Bonilla, H. R., García-Domínguez, F., & Cintra-Buenrostro, C. E. (1999). Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Marine Biology*, 135(3), 521-532

Hu, C., Li, H., Xia, J., Zhang, L., Luo, P., Fan, S., Peng, P., Yang, H & Wen, J. (2013). Spawning, larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus horrens*. *Aquaculture*, 404, 47-54.

Hyman, L. H. (1955). Class Holothuroidea. *The invertebrates: Echinodermata. The coelomate bilateria*, 4, 120-144.

James, D. B. (1996). Culture of sea-cucumber. *CMFRI Bulletin-Artificial reefs and sea farming technologies*, 48, 120-126.

James, D. B. (2001). Twenty sea cucumbers from seas around India. *Naga, The ICLARM Quarterly*, 24(1&2), 4-8.

Kerr, A. M., Janies, D. A., Clouse, R. M., Samyn, Y., Kuszak, J., & Kim, J. (2005). Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence. *Marine Biotechnology*, 7(1), 53-60.

Kinch, J., Purcell, S., Uthicke, S., & Friedman, K. (2008). Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in the Western Central Pacific. *Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy*, 5-55.

Laguarda-Figueras, A., Solís-Marín, F. A., Durán-González, A., Hernández-Pliego, P. y Del Valle García, R. 2001. Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Caribe Mexicano: Puerto Morelos, Quintana Roo, México. *AVICENNIA, Revista de Ecología, Oceanografía y Biodiversidad Tropical*, 14: 7-46

Lavitra, T., Rasolofonirina, R., Jangoux, M., & Eeckhaut, I. (2009). Problems related to the farming of *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). *SPC Béche-de-mer Information Bulletin*, 29, 20-30.

Lawrence, J. M., & Herrera, J. (2000). Stress and deviant reproduction in echinoderms. *Zoological Studies-Taipei*-, 39(3), 151-171.

Liu, X., Zhu, G., Zhao, Q., Wang, L. & Gu, B. (2004). Studies on hatchery techniques of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *FAO Fisheries Technical Paper*, 287-296.

Mladenov P., R. Emson (1988). Density, size structure and reproductive characteristics of fissiparous brittle stars in algae and sponges: evidence for interpopulational variation in levels of sexual and asexual reproduction. *Mar. Eco/; Prog. Ser.* 42, 181-194.

Mercier, A., Hidalgo, R. Y., & Hamel, J. F. (2004). Aquaculture of the Galapagos sea cucumber, *Isostichopus fuscus*. *FAO Fisheries Technical Paper*, 347-358.

Morgan, A. D. (2000). Aspects of the reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea). *Bulletin of Marine Science*, 66(1), 47-57.

Navarro, P. G., García-Sanz, S., & Tuya, F. (2012). Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). *Scientia Marina*, 76(4), 741-752.

Ong Che, R. G. (1990). Reproductive cycle of *Holothuria leucospilota* Brandt (Echinodermata: Holothuroidea) in Hong Kong and the role of body tissue in reproduction. *Asian Marine Biology*, 7, 115-132.

Ong Che, R. G., & Gomez, E. D. (1985). Reproductive periodicity of *Holothuria scabra* jaeger at Calatagan, Batangas, Philippines. *Asian Marine Biology*, 2, 21-30.

Pawson, D. L., Pawson, D. J., & King, R. A. (2010). A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Zootaxa*, 2449, 1-48.

Pérez-Ruzafa, A. (1984). Estudio sistemático, ecológico y biogeográfico de la Clase Holothuroidea en las Islas Canarias (Doctoral dissertation, Tesis de Licenciatura, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife).

Prieto, E. (2010). Taxonomía de Holothuroidea (Echinodermata) del mar del Perú. Tesis de pregrado en biología. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima – Perú. 79p.

Purcell, S.W. (2010). Manejo de las pesquerías de pepino de mar con un enfoque ecosistémico. Food and Agriculture Organization of the United Nations *FAO Documento técnico de pesca y acuicultura*.

Purcell, S. W., Samyn, Y., & Conand, C. (2012). Commercially important sea cucumbers of the world. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Raff, R. A., & Byrne, M. (2006). The active evolutionary lives of echinoderm larvae. *Heredity*, 97(3), 244-252.

Ramofafia, C., Battaglione, S. C., Bell, J. D., & Byrne, M. (2000). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. *Marine Biology*, 136(6), 1045-1056.

Ramofafia, C., Battaglione, S. C., & Byrne, M. (2001). Reproductive biology of *Actinopyga mauritiana* (Echinodermata: Holothuridae) in the Solomon Islands. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 81, 523-531.

Ramofafia, C., Byrne, M., & Battaglione, C. (2003). Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. *Marine Biology*, 142(2), 281-28

Ramos, J., D. Flores, E. F. Flores, D. Pech, J. L. Soto, F. Solís, L. Ayala, R. Del Río, J. Rendón, M. Pacheco, F. Can, Duarte A. & Aguilar F. (2012). El pepino de mar (*H. floridana*) en las costas de Campeche. Informe final de investigación. FOMIX-

Campeche-CONACYT; Secretaría de Medio Ambiente y Aprovechamiento Sustentable, Gobierno del Estado de Campeche. 79 p

Richmond R.H., Hopper D. & Martínez P. (1996). The biology and ecology of sea cucumbers. In: Suggestions for the Management of Sea cucumber resources in Micronesia. Results of the Workshop. A Regional Management Sustainable Sea Cucumber Fishery for Micronesia. Tech. Rep. 101. Univ. of Guam Mar. Lab. Pag. 7-20.

Rodríguez, A., Vergara, W., & Agudelo, V. (2013). First insight into Colombian Caribbean sea cucumbers and sea cucumber fishery. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 33, 9-13.

Roberts, D., & Bryce, C. (1982). Further observations on tentacular feeding mechanisms in holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 59(2), 151-163.

Smiley, S. (1988). The dynamics of oogenesis and the annual ovarian cycle of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea). *The Biological Bulletin*, 175(1), 79-93.

Smiley, S., McEuen, F. S., Chaffee, C., & Krishnan, S. (1991). Echinodermata: holothuroidea. *Reproduction of marine invertebrates*, 6, 663-750.

Solís-Marín, F. A., Arriaga-Ochoa, J. A., Laguarda-Figueras, A., Frontana-Uribe, S. C. & Durán-González, A. (2009). Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California. 1ra. Edición. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología – Universidad Nacional Autónoma de México - CONABIO. 177 pp.

Tapia-Vázquez, O.M., Castro-González, J.J. & Valles-Ríos, H. (1996). Madurez gonádica del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* en la costa occidental de baja California, México. *Cienc. Pesq.* 12: 5-12.

Toral-Granda, V. (2008). Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Latin America and the Caribbean. *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 516, 213-229.

Toral-Granda, V., Lovatelli, A., & Vasconcellos, M. (2008). *Sea cucumbers: a global review of fisheries and trade*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Toral-Granda, M. V., & Martínez, P. C. (2007). Reproductive biology and population structure of the sea cucumber *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875)(Holothuroidea) in Caamaño, Galápagos Islands, Ecuador. *Marine Biology*, 151(6), 2091-2098.

Tuwo, A., & Conand, C. (1992). Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(04), 745-758.

Uthicke, S. (1997). Seasonality of asexual reproduction in *Holothuria* (*Halodeima*) *atra*, *H. (H.) edulis* and *Stichopus chloronotus* (Holothuroidea: Aspidochirotida) on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 129: 435–441.

Wang, R & Cheng, Y. (2004). Breeding and culture of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, Liao. *FAO Fisheries Technical Paper*, 277-287.

Zacarías-Soto, M., Olvera-Novoa, M. A., Pensamiento-Villarauz, S., & Sánchez-Tapia, I. (2013). Spawning and Larval Development of the Four-Sided Sea Cucumber, *Isostichopus badionotus* (Selenka 1867), under Controlled Conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(5), 694-705.

Zetina Moguel C., Ríos Lara G., Hernández Herrera I., Guevara Ortiz M., Ortiz Avilés E. & Pool Gómez J. (2002). Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del Estado de Yucatán. Editorial Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.

Advances on spontaneous captive breeding and culture conditions of Caribbean sea cucumber *Stichopus* sp.

Vianys Agudelo^{1,*} and Adriana Rodríguez¹

Abstract

The sea cucumber *Stichopus* sp. is a species that inhabits the Colombian Caribbean, and little is known about their reproductive behaviour under controlled laboratory conditions. During 2012 and 2013, from July to October, spontaneous spawning and spermiation events took place in the Aquaculture Laboratory of the Universidad del Magdalena (Santa Marta, Colombia). The mean number of fertilised eggs was 48.4×10^3 , which developed up to the late auricularia stage. In this study, handling conditions, water quality and limitations associated with reproduction and larval culture are described.

Key words: reproduction, moon phase, ovocyte, *Stichopus*.

Introduction

In Asian countries there is controlled production of sea cucumbers for restocking programmes, conservation strategies and the production of natural health products (Sicuro and Levine 2011). In contrast, in South American countries, studies on the culture of species with commercial importance are emerging (Guzman et al. 2003; Guisado et al. 2012; Rodríguez et al. 2013; Zacarías-Soto et al. 2013). In Colombia, little is known about the sea cucumber species, their biology, taxonomy, population dynamics, fisheries management and culture (Caycedo 1978; Borrero-Pérez et al. 2004; Rodríguez et al. 2013).

It has been found that spawning of sea cucumbers is possible by natural means under controlled conditions. On this subject, several authors report successful results in this process (Sicuro and Levine 2011; Soliman et al. 2013; Zacarías-Soto et al. 2013), while others have obtained eggs by artificial means such as hormones, chemicals, thermal stimulation, *in vitro* fertilisation and photoperiod methods or through controlled food supply (Ong Che and Gomez 1985; Hamel et al. 1993; Conand and Byrne 1993; Morgan 2000; Ramofafia et al. 2000; Fajardo-León et al. 2008; Eeckhaut et al. 2012). That is why the environment and chemicals are considered determining factors for the controlled reproduction of these marine organisms. In addition, the influence of moon phases has been demonstrated by several authors where environmental variables do

not produce a response in organisms acclimated in controlled environments (Mercier et al. 2000; Hamel et al. 2001; Battaglione et al. 2002; Asha and Muthiah 2008; Hu et al. 2013).

In spite of the wide existing documentation, information about the reproductive behaviour and spawning methods of Caribbean holothuroids is scarce. This study provides a brief description of the reproduction and larval development of *Stichopus* sp. native of the Colombian Caribbean Sea, with notes on the problems associated through the success of the culture.

Materials and methods

Collection of animals

During their reproductive season (July to October), in 2012 and 2013, two hundred *Stichopus* sp. were purchased from local artisanal fishermen in Rodadero bay in Santa Marta, Colombia (11°13'22,73"N–74°13'32,59"O). The sea cucumbers were rapidly brought to the Aquaculture Laboratory of the Universidad del Magdalena in 20-L plastic tanks filled with seawater. There they were weighed using an analytical scale Ohaus (0.001 g), and their total length was measured with a standard measuring board (in mm). After that, the sea cucumbers were slowly allowed to acclimatise to a 550-L tank filled with ambient seawater (temperature 26°C; pH 7.8) maintained at the Aquaculture Laboratory.

¹ Aquaculture Laboratory, Group of Research and Development Technology in Aquaculture, Fisheries Engineering Program, Universidad del Magdalena, Cra 32 No. 22-08, Santa Marta, Colombia.

* Corresponding author: vianysam@gmail.com

Broodstock management

After acclimatisation in the laboratory, the animals were randomly separated and put into six circular 550-L plastic tanks at a density of 0.1 ind. L⁻¹, distributed in a recirculation system. The tanks were filled with sterilised seawater, equipped with a biological filter, and aerated by air stones. Laboratory water temperature was maintained at 26.68°C (± 0.79 SD). The sea cucumbers were exposed to a 12-h light-dark photoperiod using overhead fluorescent lights. Faeces were siphoned every day and water salinity was adjusted when needed (Fig. 1).



Figure 1. *Stichopus* sp. broodstock.

Eggs and larvae management

The broodstock was constantly monitored to observe reproductive behaviour, such as elevation of the anterior end, prominent gonopore or body wall erection.

Once the presence of gametes in the culture tanks was observed, these were removed by siphoning and a replacement of 80% of water of the breeding tanks was done. The fertilised eggs were washed with filtered seawater and sterilised, and then selected with a mesh of 60 microns. To estimate the total number of eggs, samples were withdrawn using a 1-mL aliquot. After that, they were incubated in a 50-L aquarium with soft aeration at room temperature (26°C). During the first two days of embryonic development, samples were taken every 30 minutes to monitor the morphological changes by light microscopy observations (Carl Zeiss, Modelo Primo Star), and photographic records were made with a video camera and digital photography (Axiocam ERC 55).

Feeding practices

Broodstock

Broodstock were fed from the third day of arrival to the laboratory as follows: in 2012, a microalgae powder (5 g per 100 L of powder of *Spirulina* (Artemia-International®)) was given; while in 2013, a mixture of marine sediment (previously washed and dried) was used with *Spirulina* powder at a rate of 0.5 g per 100 g of sediment.

Larvae

Two larval feeding protocols were tested. During the 2012 spawning season, powdered algal product, *Spirulina* (Artemia-International®) was used; while in 2013 the larvae were supplied with live algae (*Chlorella* sp.) at a concentration of 5,000 cells mL⁻¹.

Monitoring of the culture conditions

In 2012, water quality parameters were checked daily with a multiparameter Handy Lab: temperature of 25.14°C ± 2.02 , pH 6.96 ± 0.13 , salinity 36.4 g L⁻¹ ± 0.27 , and dissolved oxygen 6.40 mg L⁻¹ ± 0.16 . In 2013, water quality parameters were modified in order to ensure better larvae survival: temperature of 28.51°C ± 0.17 , pH 8.18 ± 0.07 , salinity 36.96 g L⁻¹ ± 0.42 , and dissolved oxygen 5.56 mg L⁻¹ ± 0.28 . The photoperiod consisted of 12 hours of light and 12 hours of dawn. Aeration was supplied by blowers (Hitachi Iced Serie G).

During incubation and to avoid the appearance of parasites, a daily siphoning of the aquarium was carried out. In addition, 30% of seawater was replaced until the blastula stage was reached and after the start of the auricularia stage, 20% daily seawater exchange was implemented.

Results and discussion

Sea cucumber spawning

From July to October 2012 and from August to October 2013, sixteen spontaneous spawning and sperm releases were presented. Reproductive events occurred within two weeks of the arrival of the sea cucumbers to the laboratory, during the hours of night and dawn. Individuals showed normal behaviour during this time. Sea cucumbers scrolled through the walls of the tanks with a prominent and

noticeable genital pore (Fig. 2). Some authors have identified the animal behaviour and the condition of the genital pore as reproductive indicators of species such as *Holothuria scabra*, *Actinopyga mauritiana* and *Stichopus* sp. (Ramofafia et al. 2003; Hu et al. 2010). Since females and males were in the same tank, fertilisation occurred in a free form and subsequent quantification enabled a total average production of 48.4×10^6 fertilised oocytes.



Figure 2. Mature adult with prominent genital pore (arrow).

In this study, the new moon seemed to exert a great influence over the sea cucumber reproduction. The greater reproductive peak occurred in September 2012, during the new moon phase (Table 1). In this period, during three consecutive days, natural spawning took place (Fig. 3). These events recorded the largest number of fertilised oocytes by month (17.1×10^6). The reproductive behaviour of this species is similar to that reported for *Isostichopus badionotus*, showing reproductive peaks from July to November, as described by various authors (Guzman et al. 2003; Foglietta et al. 2004; Zacarias-Soto et al. 2013).

Some studies have established that the lunar cycle has a major role in the reproduction of species such as *Stichopus* sp., *H. scabra*, *I. fuscus* and *I. badionotus*, enabling the prediction of reproductive events based on lunar periodicity (Babcock et al. 1992; Mercier et al. 2000). Thus, their influence is possibly related to endogenous rhythms of each species. *Stichopus* sp. spawning occurs between the first and second night after the new moon from May to August, both in captivity and in the wild. It has also been referenced in

species such as *A. japonicus*, *H. scabra*, *I. fuscus*, *Polychaeta rufescens*, *Pearsonothuria graeffei*, *S. hermanni* (Kubota and Tomari 1998; Morgan 2000; Hamel et al. 2002, 2003; Mercier et al. 2007; Hu et al. 2013; Soliman et al. 2013), and in the wild, *B. argus*, *Euapta godeffroyi*, *S. chloronotus* and *H. tubulosa* (Babcock et al. 1992; Andrade et al. 2008). Although spawning presented in this study was associated with the moon phase, it is necessary to evaluate a longer period to confirm whether this is a species reproductive pattern, as the moon phases have been associated to the reproduction and may vary among species.

Table 1. Production of fertilised eggs of *Stichopus* sp. under laboratory conditions.

Moon phase	Spawning date	Fertilised eggs $\times 10^6$
Third quarter	Jul-10-2012	1.2
New moon	Aug-20-2012	4.0
	Sept-17-2012	12.3
	Sept-18-2012	2.1
	Sept-20-2012	3.3
Menguante	Oct-10-2012	5.3
New moon	Aug-6-2013	2.4
	Aug-7-2013	1.5
	Aug-8-2013	1.7
	Aug-9-2013	1.8
	Sept-5-2013	2.1
	Sept-6-2013	1.8
	Sept-7-2013	3.2
	Oct-5-2013	3.0
	Oct-6-2013	1.2
	Oct-7-2013	1.5



Figure 3. *Stichopus* sp. female spawning.

Larviculture

Embryonic development of *Stichopus* sp. is shown in Figure 4 and Table 2. In 2012, once the larvae reached the early auricularia stage, they did not continue the metamorphosis and, after a month, 100% mortality was recorded. In addition, during this period, the larvae did not change the stage. In 2013, ten days after fertilisation, the larvae successfully developed until late auricularia (Fig. 4) but an

infestation of copepods and protozoa caused 100% mortality. Thus, during larval rearing, mortality, possibly associated with the water quality management, was recorded. The occurrence of protozoan parasites during sea cucumber larviculture is a common problem that has been documented by several authors (Purcell and Eeckhaut 2005; Raison 2008; Hu et al. 2010, 2013). Becker et al. (2009) reported that these microorganisms appear after the hatching period and once the larvae start feeding, they feed on the

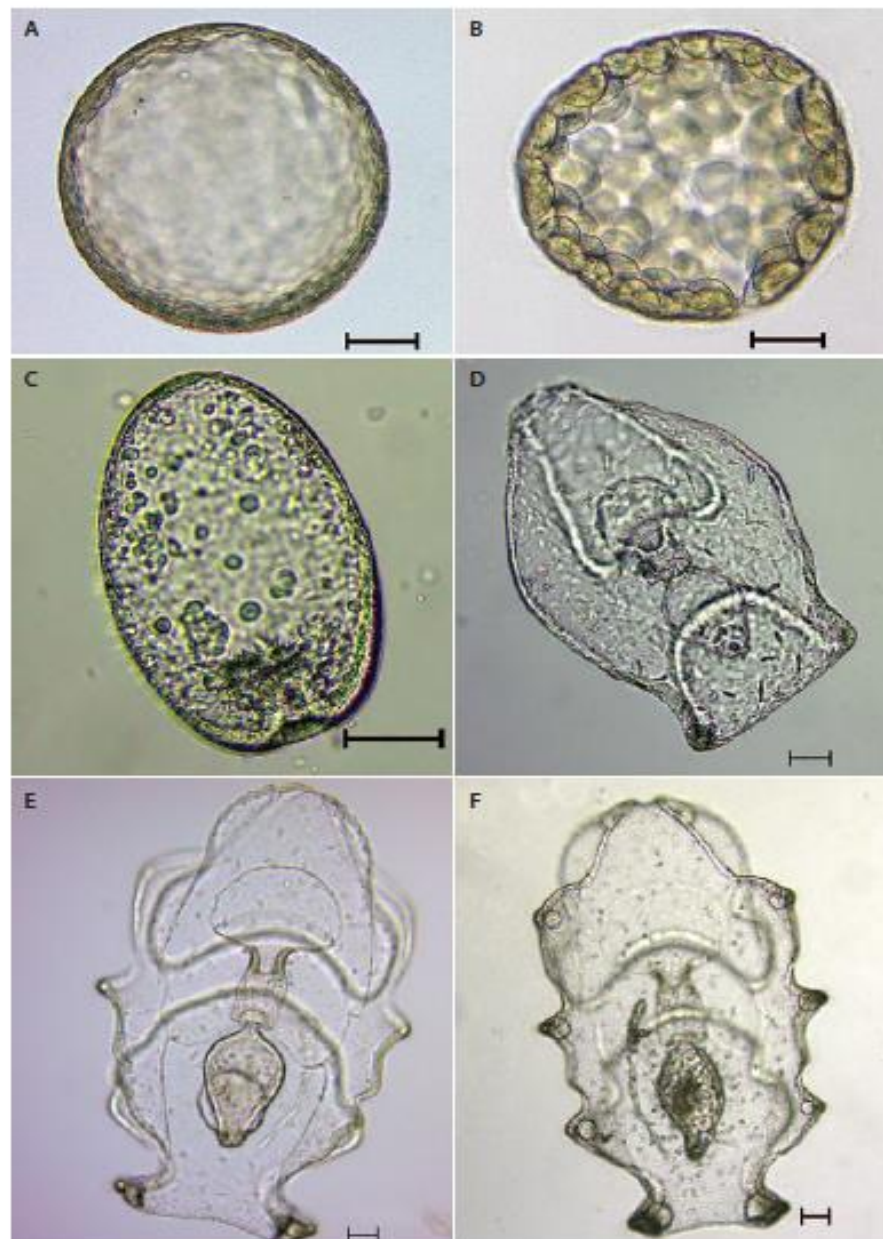


Figure 4. Embryonic and larval development of *Stichopus* sp. Embryonic phases: A) Fertilised egg; B) Blastula; C) Gastrula. Planktonic larval phases: D) Early auricularia; E) Mid auricularia; F) Late auricularia (Scale bar 20 μ m).

Table 2. Characterisation of embryonic development of *Stichopus* sp.

Stages	Characteristics	Size (µm)	Time
Fertilised egg	Spherical.	138.02–175.05	0
Blastula	Spherical. It has a cover of cilia that keeps it in constant rotary motion around its axis.	262.72–302.79	4–5 (h)
Gastrula	Invagination of the vegetal pole. Appearance of the rudiments of the digestive tract.	287.40–356.30	8–10 (h)
Early auricularia	Elongation of the larva. Presence of oral cilia, intestine and cloaca.	425.30–476.50	30–40 (h)
Mid auricularia	Larger larvae with larger fold sides and better differentiated and developed digestive tract.	609.28–788.83	50–60 (h)
Late auricularia	Accumulation of hyaline spheres and development of axohydroceloma.	787.59–1,087.66	21–23 (d)

gut contents and tissues, causing shrinkage and rupture of the intestinal wall, killing the larvae within one to three days. Two preventive actions in *I. fuscus* culture are a decrease in water temperature and increased aeration, but low temperatures and strong agitation generate an adverse effect, which is noticeable in the delay or interruption of larval development (Becker et al. 2009; Mercier et al. 2012). Further to this, in Japan and India, chemical treatments are implemented to remove copepods in hatcheries (James 1994; Ito 1995; Yanagisawa 1998; Ito and Kitamura 1997). As stated by Battaglione and Bell (2004), Trichlorfon or Dipterex are used to control copepod infestation. In this study, sterilisation and filtering of seawater were insufficient to control the problem. Therefore, tests must be performed with different doses of Trichlorfon / Dipterex to find out the optimal concentration required for controlling copepod infestation.

Several authors have noted that larval development is directly related to water quality management as temperature, pH, or salinity. In addition, the quantity and quality of the food supply are key factors in the success of hatchery sea cucumber. As noted by James (1994), Ramofafia et al. (1995), and Battaglione (1999), who studied holothuroids (*H. scabra*, *A. echinites* and *H. atra* respectively), optimal water temperature for tropical sea cucumber larvae is between 27 and 30°C, values which are within the range of the larvae cultured in this study. Authors such as Hamel and Mercier (1996) or Asha and Muthiah (2005) state that a pH of 7.8 to 8.0, is an appropriate value for optimal larval growth in *C. frondosa* and *H. spinifera*; in our study, and in 2012, this factor remained below the optimal range suggested by other authors. In this study, it was not possible to determine whether this factor directly influenced the development and survival of larvae, although in 2013, pH value remained constant (8.18), and culture conditions were improved. Additionally, salinity is also an important factor for larval development of sea cucumbers as the larvae cannot tolerate values below 32 g L⁻¹; such values

can cause deformities and high mortality, as has happened in species such as *H. spinifera*, *A. echinites* and *A. japonicus* (Chen and Chian 1990; Asha and Muthiah 2002; Kashenko 2002). In this study, salinity did not have any effect on the larvae; this parameter remained constant and optimal for both hatchery periods (2012 and 2013).

In this study, larval development was influenced by temperature and food supply: during the first spawning, obtained between July and September 2012, larval development stopped at early auricularia, and larval sizes were inferior to all of those achieved in 2013 (August–October). That year, live microalgae (*Chlorella* sp.) supply and higher temperature (28°C) resulted in improved conditions for larval culture and advanced the development of the larvae until late auricularia stage. The sizes of the larvae are shown in Figure 5.

Becker et al. (2009), state that growing larvae need to be fed with abundant and high quality live microalgae, especially during the auricularia stage. In case of failure in this requirement, larvae growth and metamorphosis are significantly delayed for long periods, as happened in the first year of our study. Some authors have suggested the use of some algae of the genus *Spirulina* for food in the early stages (Agudo 2006; Zacarias-Soto et al. 2013) but this is only useful during pentactula or juvenile stages because they are benthic (the added *Spirulina* falls to the bottom of the tank). Therefore, in 2013, *Chlorella* sp. was cultured and added as feed during the auricularia stage. As reported by Xilin (1986), Asha (2004) or Asha and Muthiah (2006), its use mixed with other algae (such as *Dunaliella eichlaia*, *Chaetoceros gracilis*, *C. muelleri*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis salina*, *Dicrateria zhuanjiangensis*, *Pavlova lutheri* and *Tetraselmis chuii*) is a key factor during this stage of culture development.

In 2013, we established that food was ingested by the larvae due to the green gut colouration (Fig. 6). At day ten of the culture, these larvae reached a

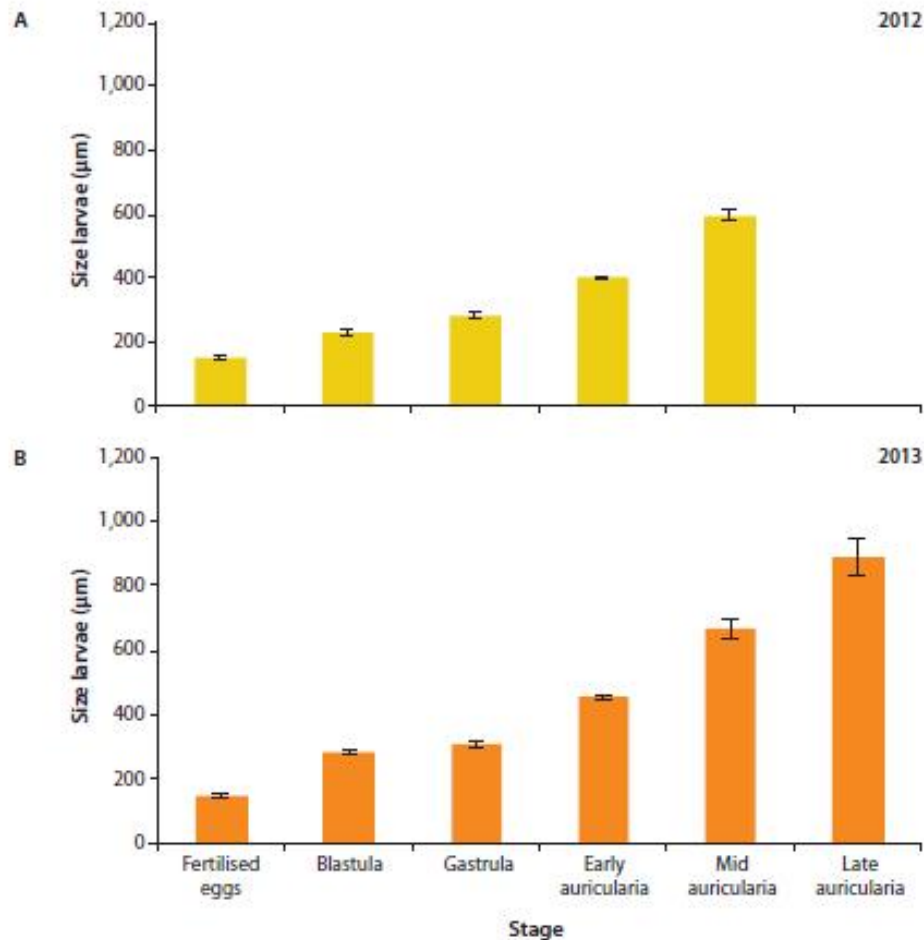


Figure 5. Larvae sizes in each of the reproductive periods under culture conditions:
 A) 2012: Temperature 26°C and feeding with *Spirulina* powder;
 B) 2013: Temperature 28°C and feeding with *Chlorella* sp. at a density of 5,000 cells mL⁻¹.



Figure 6. Late auricularia feeding microalgae (*Chlorella* sp.). Note green gut. Scale bar 20 µm.

maximum size of 888.71 µm ±106.71, when development stopped due to new copepod infestation that stopped the larval cycle and as well larvae metamorphosis.

Conclusion

Stichopus sp. reproduction is feasible under laboratory conditions since the species is easy handling and adapts to captivity. In addition, their spawning is continuous from July to November. Our findings will provide the basis for their reproduction under laboratory conditions and in turn promote the development of other related larval feeding studies to optimise sea cucumber production and survival and guarantee larvae requirements for growth and metamorphosis.

Acknowledgments

This work was supported by a Colciencias Grant (No 1117-521-28356) and Vicerrectoría de Investigación (Universidad del Magdalena). The authors would like to thank the sea cucumber fishermen Jorge Polo Ramírez, who helped to collect holothurians, and Eng. Yahir Mendoza Vanegas.

References

- Agudo N. 2006. Sandfish hatchery techniques. Australian Centre for International Agricultural Research, Secretariat of the Pacific Community and the World Fish Center, Noumea. 44 p.
- Andrade Á.A., Machado L.F., Barreiros J.P., Paulay G. and Cardigos F. 2008. In situ observation of sexual reproduction of *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) (Echinodermata: Holothuroidea) in the Azores (NE Atlantic). SPC Beche-de-mer Information Bulletin 27:43–45.
- Asha P.S. 2004. Effect of feed concentrations on larval growth, survival and development of *Holothuria* (*Theclothuria*) *spinifera* Theel. Journal of the Marine Biological Association of India 46(1):80–86.
- Asha P.S. and Muthiah P. 2002. Spawning and larval rearing of the sea cucumber *Holothuria* (*Theclothuria*) *spinifera* Theel. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 16:11–15.
- Asha P.S. and Muthiah P. 2005. Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. Aquaculture 250:823–829.
- Asha P.S. and Muthiah P. 2006. Effects of single and combined microalgae on larval growth, development and survival of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. Aquaculture Research 37(2):113–118.
- Asha P.S. and Muthiah P. 2008. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. Aquaculture International 16:231–242.
- Babcock R., Mundy C., Kessing J. and Oliver J. 1992. Predictable and unpredictable spawning events: In situ behavioural data from free-spawning coral reef invertebrates. Invertebrates Reproduction and Development 22:210–228.
- Battaglene S.C. 1999. Culture of the tropical sea cucumbers for the purpose of stock restoration and enhancement. Naga, the ICLARM Quarterly 22(4):4–11.
- Battaglene S.C. and Bell J.D. 2004. The restocking of sea cucumbers in the Pacific Islands. p. 109–132. In: Bartley D.M. and Leber K.M. (eds). Marine Ranching. FAO Fishery Technical Paper No. 429. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 213 p.
- Battaglene S.C., Seymour E.J., Ramofafia C. and Lane I. 2002. Spawning induction of three tropical sea cucumbers *Holothuria scabra*, *Holothuria fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. Aquaculture 207:29–47.
- Becker P., Eeckhaut I., Ycaza R.H., Mercier A. and Hamel J.-F. 2009. Protozoan disease in larval culture of the edible sea cucumber *Isostichopus fuscus*. p. 571–573. In: Harris L.G., Bottger S.A., Walker C.W. and Lesser M.P. (eds). Echinoderms. London, United Kingdom: CRC Press.
- Borrero-Pérez G., Benavides-Serrato M., Solano O. and Navas R. 2004. Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) recolectados en el talud continental superior del Caribe Colombiano. Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente 42(1,2):68–85.
- Caycedo I.E. 1978. Holothuroidea (Echinodermata) de aguas someras en la Costa Norte de Colombia. Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín 10:149–198.
- Chen C.P. and Chian C.S. 1990. Short note on the larval development of the sea cucumber *Actinopyga echinites* (Echinodermata: Holothuroidea). Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica 29:127–133.
- Conand C. and Byrne M. 1993. A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries. Marine Fisheries Review 55(4):1–13.
- Eeckhaut I., Lavitra T., Léonet A., Jangoux M. and Rasolofonirina R. 2012. In vitro fertilisation: A simple, efficient method for obtaining sea cucumber larvae year round. Asia-Pacific tropical sea cucumber aquaculture 136:40–49.
- Fajardo-León M.C., Suárez-Higuera M.C.L., Del Valle-Manríquez A. and Hernández-López A. 2008. Biología reproductiva del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea) de Isla Natividad y Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. Ciencias Marinas 34(002):165–177.
- Foglietta L.M., Camejo M.I., Gallardo L. and Herrera F.C. 2004. A maturity index for holothurians exhibiting asynchronous development of gonad tubules. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 303:19–30.
- Guisado C., Carrasco S.A., Díaz-Guisado D., Maltrain R. and Rojas H. 2012. Embryonic development, larval morphology and juvenile growth of the sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochiroidea). Revista de Biología Marina y Oceanografía 47(1):65–73.
- Guzmán H., Guevara C. and Hernández I. 2003. Reproductive cycle of two commercial species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from Caribbean Panama. Marine Biology 142(2):271–279.

- Hamel J.-F. and Mercier A. 1996. Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(2):253–271.
- Hamel J.-F., Himmelman J.H. and Dufresne L. 1993. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). *Biological Bulletin* 184:125–143.
- Hamel J.-F., Conand C., Pawson D.L. and Mercier A. 2001. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): Its biology and exploitation as beche-de-mer. *Advances in Marine Biology* 41:129–233.
- Hamel J.-F., Pawson D.L., Conand C. and Mercier A. 2002. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): Its biology and its exploitation as beche-de-mer. *Advanced Marine Biology* 41:131–233.
- Hamel J.-F., Hidalgo R.Y. and Mercier A. 2003. Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin* 18:3–8.
- Hu C., Xu Y., Wen J., Zhang L., Fan S. and Su T. 2010. Larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus* sp. (Curry fish). *Aquaculture* 300(1):73–79.
- Hu C., Li H., Xia J., Zhang L., Luo P., Fan S. and Wen J. 2013. Spawning, larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus horrens*. *Aquaculture* 404:47–54.
- Ito S. 1995. Studies on the technical development of the mass production for sea cucumber juvenile, *Stichopus japonicus*. Hatchery Manual. Saga, Japan: Saga Prefectural Sea Farming Center. 87 p.
- Ito S. and Kitamura H. 1997. Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Stichopus japonicus* by periphytic diatoms. *Hydrobiologia* 358:281–284.
- James D.B. 1994. Seed production in sea cucumbers. *Aquaculture International* 1(9):15–26.
- Kashenko S.D. 2002. Reactions of the larvae of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* to sharp desalination of surface water. A laboratory study. *SPC Beche de Mer Information Bulletin* 15:11–15.
- Kubota T. and Tomari M. 1998. Reproduction in the apodid sea cucumber *Polycheira rufescens*: Semilunar spawning rhythm and sex change. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 78(01):249–267.
- Mercier A., Battaglene S.C. and Hamel J.-F. 2000. Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Solomon Islands. *Hydrobiologia* 440:81–100.
- Mercier A., Ycaza R.H. and Hamel J.-F. 2007. Long-term study of gamete release in a broadcast-spawning holothurian: Predictable lunar and dial periodicities. *Marine Ecology Progress Series* 329:179–189.
- Mercier A., Ycaza R.H., Espinoza R., Haro V.M.A. and Hamel J.-F. 2012. Hatchery experience and useful lessons from *Isostichopus fuscus* in Ecuador and Mexico. *ACIARSPC Asia-Pacific tropical sea cucumber aquaculture symposium* 136:79–90.
- Morgan A.D. 2000. Induction of spawning in the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea). *Journal of the World Aquaculture Society* 31:186–194.
- Ong Che R.G. and Gomez E.D. 1985. Reproductive periodicity of *Holothuria scabra* Jaeger at Calatagan, Batangas, Philippines. *Asian Marine Biology* 2:21–29.
- Purcell S.W. and Eeckhaut I. 2005. An external check for disease and health of hatchery-produced sea cucumbers. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 22:34–38.
- Raison C.M. 2008. Advances in sea cucumber aquaculture and prospects for commercial culture of *Holothuria scabra*. *CAB Reviews* 3(82):1–15.
- Ramofafia C., Gervis M. and Bell J. 1995. Spawning and early larval rearing of *Holothuria atra*. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin* 7:2–6.
- Ramofafia C., Battaglene S.C., Bell J.D. and Byrne M. 2000. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. *Marine Biology* 136:1045–1056.
- Ramofafia C., Byrne M. and Battaglene C. 2003. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. *Marine Biology* 142(2):281–288.
- Rodríguez A., Vergara W. and Agudelo V. 2013. First insight into Colombian Caribbean sea cucumbers and sea cucumber fishery. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin* 33:9–13.
- Sicuro B. and Levine J. 2011. Sea cucumber in the Mediterranean: A potential species for aquaculture in the Mediterranean. *Reviews in Fisheries Science* 19(3):299–304.
- Soliman T., Yamazaki Y., Niiyama H. and Tsunoda K. 2013. Spontaneous captive breeding and larval development in the green and red variants of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867). *Aquaculture Research* 44(5):738–746.
- Xilin S. 1986. Advances and prospects of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) aquaculture in China. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin* 19:16.
- Yanagisawa T. 1998. Aspects of the biology and culture of the sea cucumber. p. 292–308. In: De Silva S.S. (ed.). *Tropical Mariculture*. London, United Kingdom: Academic Press. 487 p.
- Zacarías-Soto M., Olvera-Novoa M.A., Pensamiento-Villaraiz S. and Sánchez-Tapia I. 2013. Spawning and larval development of the four-sided sea cucumber, *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867), under controlled conditions. *Journal of the World Aquaculture Society* 44(5):694–705.

CONCLUSIONES GENERALES

Esta especie tiene un pico reproductivo durante el segundo semestre del año (julio-noviembre), comprobado por el análisis del índice gonadosomático y la caracterización del desarrollo gonadal, este último identificado a través del uso de técnicas histológicas y análisis de imágenes que facilitan entender la evolución del ciclo oogénico.

Existe desplazamiento de un mes entre la sincronización del periodo de madurez gonadal en machos con respecto a las hembras.

Existe una diferenciación estructural del tejido conectivo del folículo ovárico que permite distinguir las fases de inmaduro vs. maduro; los ovocitos inmaduros poseen un tamaño promedio de 30.14 μm ; mientras que los maduros alcanzan un tamaño de 125.24 μm .

Para mejorar la producción de larvas en condiciones controladas, se debe asegurar una calidad de agua óptima, que incluye la eliminación de vectores patógenos.

OBSERVACIONES FINALES

Los resultados del Macroproyecto cofinanciado por Colciencias se han documentado de manera escrita y oral. Así, se han publicado tres artículos en revistas indexadas internacionales. Dos artículos han sido publicados en una revista especializada en el tema (*Bulletin Bêche de mer*, 2013 y 2015). Otro más se ha publicado en una revista no científica, de difusión internacional (INFOPECSA INTERNACIONAL, 2013). Por otro lado, se encuentra en prensa un artículo sobre morfoanatomía del tubo digestivo de pepinos de mar, en la Revista de Biología Tropical de Costa Rica. En otros casos, se han realizado exposiciones orales en congresos de carácter internacional, en donde paulatinamente se han ido exponiendo los avances del trabajo, tales como la 65 GCFI (2012), la IV Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos y *Latin American and Caribbean Aquaculture* 2013 y en el Congreso Mundial de Acuicultura de la WAS 2014.

Se elaboraron tres tesis: dos de Maestría y una de Pregrado.

A partir del estudio realizado en este tiempo se logró compilar una importante información, inexistente hasta el momento en el país: biología, aclimatación, mantenimiento, cultivo, dietas, desove, composición proximal. Se está preparando una publicación sobre identificación genética de especies. Las bases que se obtuvieron, serán determinantes para el desarrollo a futuro del paquete tecnológico del cultivo. Estas especies son una importante fuente de alimento. Muy nutritivas y

además, con un componente medicinal extraordinario. Su valoración comercial en los mercados internacionales es indiscutible.

RECOMENDACIONES

Se aconseja evaluar el ciclo gametogénico del pepino de mar durante varias temporadas anuales con el fin de complementar este estudio.

Aplicar técnicas bioquímicas con el fin de profundizar en los mecanismos fisiológicos que influyen en la formación y maduración de los gametos sexuales de los individuos.

Es necesario realizar más estudios acerca de la alimentación durante el cultivo larvario del pepino de mar bajo condiciones de laboratorio.